

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 29 novembre 1999 (29.11.99)	
Demande internationale no PCT/FR99/00874	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339790/17469
Date du dépôt international (jour/mois/année) 14 avril 1999 (14.04.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 14 avril 1998 (14.04.98)
Déposant CHEVALET, Laurent etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

02 novembre 1999 (02.11.99)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Kiwa Mpay

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

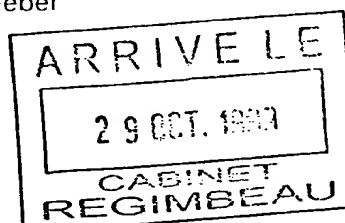
# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

**PCT**

**AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA  
COMMUNICATION DE LA DEMANDE  
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES**  
(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:  
MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE



Date d'expédition (jour/mois/année) 21 octobre 1999 (21.10.99)		<b>AVIS IMPORTANT</b>	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339790/17469			
Demande internationale no PCT/FR99/00874	Date du dépôt international (jour/mois/année) 14 avril 1999 (14.04.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 14 avril 1998 (14.04.98)	
Déposant PIERRE FABRE MEDICAMENT etc			

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:  
**AU,CN,EP,JP,US**

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:  
**BR,CA,MX**

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 21 octobre 1999 (21.10.99) sous le numéro WO 99/53080

## RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

## RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé J. Zahra no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

[stamp]

Date of mailing (day/month/year) 21 October 1999 (21.10.99)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 339790/17469			
International application No. PCT/FR99/00874	International filing date (day/month/year) 14 April 1999 (14.04.99)	Priority date (day/month/year) 14 April 1998 (14.04.98)	
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT etc			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,CN,EP,JP,US  
In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, each designated Office will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).
2. The following designated Offices have waived their requirement whereby this communication must take place by that date:  
BR,CA,MX  
Communication will take place only when requested by these Offices. Moreover, the applicant is not required to furnish a copy of the international application to the Offices in question (Rule 49.1)a-bis)).
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on

21 October 1999 (21.10.99) under No. WO/ 99/53080

REMINDER REGARDING CHAPTER 11 (Article 31.2)a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39.1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer:  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22)338.83.38

# PCT

## REQUETE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)  
(12 caractères au maximum) 339790/17469

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION NOUVELLES CONSTRUCTIONS POUR L'EXPRESSION  
CONTROLEE DE PROTEINES RECOMBINANTES DANS DES CELLULES PROCARYOTES

Cadre n° II DEPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

PIERRE FABRE MEDICAMENT  
45 Place Abel Gance  
92100 BOULOGNE-BILLANCOURT  
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) :  
FR

Domicile (nom de l'Etat) :  
FR

Cette personne est  
déposant pour :

☐ tous les Etats  
désignés

☒ tous les Etats désignés sauf  
les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis d'Amérique  
seulement

☐ les Etats indiqués dans  
le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

CHEVALET Laurent  
2 Rue des Acacias  
74100 ANNEMASSE  
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée,  
ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :  
FR

Domicile (nom de l'Etat) :  
FR

Cette personne est  
déposant pour :

☐ tous les Etats  
désignés

☐ tous les Etats désignés sauf  
les Etats-Unis d'Amérique

☒ les Etats-Unis d'Amérique  
seulement

☐ les Etats indiqués dans  
le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRESENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/à été désignée pour agir au nom  
du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒ mandataire

☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPF Robert, AHNER Francis  
WARCOIN Jacques, TEXIER Christian, LE FORESTIER Eric  
CABINET REGIMBEAU  
26 Avenue Kléber  
75116 PARIS  
FRANCE

n° de téléphone

01 45 00 92 02

n° de télécopieur

01 45 00 46 12

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/ n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

## Suite du cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

*Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.*

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

ROBERT Alain  
12 Rue de Romagny  
74100 ANNEMASSE  
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :  
FR

Domicile (nom de l'Etat) :  
FR

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

BONNEFOY Jean-Yves  
Les Noyers  
74250 LE SAPPEY  
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :  
FR

Domicile (nom de l'Etat) :  
FR

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

NGUYEN Thien Ngoc  
7 Rue Les Petits Hutins Lathoy  
74160 SAINT-JULIEN-EN-GENEVOIS  
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :  
FR

Domicile (nom de l'Etat) :  
FR

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☐ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

**Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS**

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées: une au moins doit l'être):

**Brevet régional**

- ☐ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☐ EA Brevet eurasien : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasien et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☐ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) . . . . .

**Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanie . . . . .                                    | <input type="checkbox"/> LS Lesotho . . . . .                               |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie . . . . .                                    | <input type="checkbox"/> LT Lituanie . . . . .                              |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche . . . . .                                   | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg . . . . .                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie . . . . .                       | <input type="checkbox"/> LV Lettonie . . . . .                              |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan . . . . .                                | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova . . . . .                 |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine . . . . .                         | <input type="checkbox"/> MG Madagascar . . . . .                            |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade . . . . .                                    | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine . . . . . |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie . . . . .                                   | <input type="checkbox"/> MN Mongolie . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brésil . . . . .                          | <input type="checkbox"/> MW Malawi . . . . .                                |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus . . . . .                                    | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexique . . . . .                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada . . . . .                          | <input type="checkbox"/> NO Norvège . . . . .                               |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein . . . . .              | <input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande . . . . .                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN Chine . . . . .                           | <input type="checkbox"/> PL Pologne . . . . .                               |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba . . . . .                                       | <input type="checkbox"/> PT Portugal . . . . .                              |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque . . . . .                         | <input type="checkbox"/> RO Roumanie . . . . .                              |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne . . . . .                                  | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie . . . . .                  |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark . . . . .                                   | <input type="checkbox"/> SD Soudan . . . . .                                |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie . . . . .                                    | <input type="checkbox"/> SE Suède . . . . .                                 |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne . . . . .                                    | <input type="checkbox"/> SG Singapour . . . . .                             |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande . . . . .                                   | <input type="checkbox"/> SI Slovénie . . . . .                              |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni . . . . .                                | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie . . . . .                             |
| <input type="checkbox"/> GD Grenade . . . . .                                    | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone . . . . .                          |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie . . . . .                                    | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan . . . . .                           |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana . . . . .                                      | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan . . . . .                          |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie . . . . .                                     | <input type="checkbox"/> TR Turquie . . . . .                               |
| <input type="checkbox"/> HR Croatie . . . . .                                    | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago . . . . .                     |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie . . . . .                                    | <input type="checkbox"/> UA Ukraine . . . . .                               |
| <input type="checkbox"/> ID Indonésie . . . . .                                  | <input type="checkbox"/> UG Ouganda . . . . .                               |
| <input type="checkbox"/> IL Israël . . . . .                                     | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique . . . . .      |
| <input type="checkbox"/> IN Inde . . . . .                                       | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan . . . . .                           |
| <input type="checkbox"/> IS Islande . . . . .                                    | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam . . . . .                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon . . . . .                           | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie . . . . .                           |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya . . . . .                                      | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe . . . . .                              |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan . . . . .                               |   |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée . . . . . |   |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée . . . . .                        |   |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan . . . . .                                 |   |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie . . . . .                               |   |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka . . . . .                                  |   |
| <input type="checkbox"/> LR Libéria . . . . .                                    |   |

Cases réservées pour la désignation (aux fins d'un brevet national) d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :-

- ☐ AE Émirats Arabes Unis . . . . .
- ☐ ZA Afrique du Sud . . . . .

**Déclaration concernant les désignations de précaution :** outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITE				
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 14 AVRIL 1998 (14/04/98)	98 04638	FRANCE		
(2)				
(3)				

☐ 1. l'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) :

\* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii). Voir le cadre supplémentaire.

#### Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) :

ISA / EP

Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) :

Date (jour/mois/année)

18 DECEMBRE 1998

Numéro

FA 557253

Pays (ou office régional)

OEB

#### Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DEPOT

La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant :

requête	4
description (sauf partie réservée au listage des séquences)	27
revendications	4
abrégé	1
dessins	4
partie de la description réservée au listage des séquences	
<b>Nombre total de feuilles</b>	<b>40</b>

Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale :

1. ☐ feuille de calcul des taxes
2. ☒ pouvoir distinct signé
3. ☐ copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant :
4. ☐ explication de l'absence d'une signature
5. ☒ document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) :
6. ☐ traduction de la demande internationale en (langue) :
7. ☐ indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés
8. ☐ listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur
9. ☒ autres éléments (préciser) Copie du Rapport de Recherche

Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :

Langue de dépôt de la demande internationale :

Français

#### Cadre n° IX SIGNATURE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE

A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.

WARCOIN Jacques

**CABINET REGINSEAU**  
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
28, Avenue Kélar  
75114 PARIS FRANCE

Réservé à l'office récepteur

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus :  <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Réservé au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE  
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

ARRIVE LE

19 MAI 1999

CABINET  
REGIMBEAU

Date d'expédition (jour/mois/année) 06 mai 1999 (06.05.99)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339790/17469	Demande internationale no PCT/FR99/00874

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Nom(s) du ou des déposants et de l'Etat ou des Etats pour lesquels ils sont déposants:

PIERRE FABRE MEDICAMENT (pour tous les Etats désignés sauf US)  
CHEVALET, Laurent etc. (pour US seulement)

Date du dépôt international : 14 avril 1999 (14.04.99)

Date(s) de priorité revendiquée(s) : 14 avril 1998 (14.04.98)

Date de réception de l'exemplaire original  
par le Bureau international : 27 avril 1999 (27.04.99)

Liste des offices désignés :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : AU, BR, CA, CN, JP, MX, US

## ATTENTION

Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international.

En outre, l'attention du déposant est appelée sur les renseignements donnés dans l'annexe en ce qui concerne

- ☒ les délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale
- ☒ la confirmation des désignations faites par mesure de précaution
- ☐ les exigences relatives aux documents de priorité.

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

n° de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Philippe Bécamel



n° de téléphone (41-22) 338.83.38

002607071



## RENSEIGNEMENTS CONCERNANT LES DELAIS DANS LESQUELS DOIT ETRE ABORDEE LA PHASE NATIONALE

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices désignés indiqués sur la notification de la réception de l'exemplaire original (formulaire PCT/IB/301) en payant les taxes nationales et en remettant les traductions, telles qu'elles sont prescrites par les législations nationales.

Le délai d'accomplissement de ces actes de procédure est de **20 MOIS** à compter de la date de priorité ou, pour les Etats désignés qui ont été élus par le déposant dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure, de **30 MOIS** à compter de la date de priorité, à condition que cette élection ait été effectuée avant l'expiration du 19<sup>e</sup> mois à compter de la date de priorité. Certains offices désignés (ou élus) ont fixé des délais qui expirent au-delà de 20 ou 30 mois à compter de la date de priorité. D'autres offices accordent une prolongation des délais ou un délai de grâce, dans certains cas moyennant le paiement d'une taxe supplémentaire.

En plus de ces actes de procédure, le déposant devra dans certains cas satisfaire à d'autres exigences particulières applicables dans certains offices. Il appartient au déposant de veiller à remplir en temps voulu les conditions requises pour l'ouverture de la phase nationale. La majorité des offices désignés n'envoient pas de rappel à l'approche de la date limite pour aborder la phase nationale.

Des informations détaillées concernant les actes de procédure à accomplir pour aborder la phase nationale auprès de chaque office désigné, les délais applicables et la possibilité d'obtenir une prolongation des délais ou un délai de grâce et toutes autres conditions applicables figurent dans le volume II du Guide du déposant du PCT. Les exigences concernant le dépôt d'une demande d'examen préliminaire international sont exposées dans le chapitre IX du volume I du Guide du déposant du PCT.

GR et ES sont devenues liées par le chapitre II du PCT le 7 septembre 1996 et le 6 septembre 1997, respectivement, et peuvent donc être élues dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure présentée le 7 septembre 1996 (ou à une date postérieure) ou le 6 septembre 1997 (ou à une date postérieure), respectivement, quelle que soit la date de dépôt de la demande internationale (voir le second paragraphe, ci-dessus).

Veuillez noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

## CONFIRMATION DES DESIGNATIONS FAITES PAR MESURE DE PRECAUTION

Seules les désignations expresses faites dans la requête conformément à la règle 4.9.a) figurent dans la présente notification. Il est important de vérifier si ces désignations ont été faites correctement. Des erreurs dans les désignations peuvent être corrigées lorsque des désignations ont été faites par mesure de précaution en vertu de la règle 4.9.b). Toute désignation ainsi faite peut être confirmée conformément aux dispositions de la règle 4.9.c) avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité. En l'absence de confirmation, une désignation faite par mesure de précaution sera considérée comme retirée par le déposant. Il ne sera adressé aucun rappel ni invitation. Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration précisant l'Etat désigné concerné (avec l'indication de la forme de protection ou de traitement souhaitée) et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.

## EXIGENCES RELATIVES AUX DOCUMENTS DE PRIORITE

Pour les déposants qui n'ont pas encore satisfait aux exigences relatives aux documents de priorité, il est rappelé ce qui suit.

Lorsque la priorité d'une demande nationale, régionale ou internationale antérieure est revendiquée, le déposant doit présenter une copie de cette demande antérieure, certifiée conforme par l'administration auprès de laquelle elle a été déposée ("document de priorité"), à l'office récepteur (qui la transmettra au Bureau international) ou directement au Bureau international, avant l'expiration d'un délai de 16 mois à compter de la date de priorité, étant entendu que tout document de priorité peut être présenté au Bureau international avant la date de publication de la demande internationale, auquel cas ce document sera réputé avoir été reçu par le Bureau international le dernier jour du délai de 16 mois (règle 17.1.a)).

Lorsque le document de priorité est délivré par l'office récepteur, le déposant peut, au lieu de présenter ce document, demander à l'office récepteur de le préparer et de le transmettre au Bureau international. La requête à cet effet doit être formulée avant l'expiration du délai de 16 mois et peut être soumise au paiement d'une taxe (règle 17.1.b)).

Si le document de priorité en question n'est pas fourni au Bureau international, ou si la demande adressée à l'office récepteur de préparer et de transmettre le document de priorité n'a pas été faite (et la taxe correspondante acquittée, le cas échéant) avant l'expiration du délai applicable mentionné aux paragraphes précédents, tout Etat désigné peut ne pas tenir compte de la revendication de priorité; toutefois, aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Lorsque plusieurs priorités sont revendiquées, la date de priorité à prendre en considération aux fins du calcul du délai de 16 mois est la date du dépôt de la demande la plus ancienne dont la priorité est revendiquée.

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques  
Cabinet Regimbeau  
26, avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 06 mai 1999 (06.05.99)	<b>NOTIFICATION IMPORTANTE</b>
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339790/17469	
Demande internationale no PCT/FR99/00874	
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	
Date du dépôt international (jour/mois/année) 14 avril 1999 (14.04.99)	
Date de priorité (jour/mois/année) 14 avril 1998 (14.04.98)	
Déposant PIERRE FABRE MEDICAMENT etc	

- La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
- Un astérisque(\*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.


<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
14 avri 1998 (14.04.98)	98/04638	FR	27 avri 1999 (27.04.99)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Philippe Bécamel



no de téléphone (41-22) 338.83.38

002607072

# PATENT COOPERATION TREATY



## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference 339790/17469	<b>FOR FURTHER ACTION</b>		See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/FR99/00874	International filing date (day/month/year) 14/04/1999	Priority date (day/month/year) 14/04/1998	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/71			
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.			

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 5 sheets including this title page.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of Administrative Instructions of the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 4 sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul>

Date of submission of the demand 02/11/1999	Date of completion of this report 07.07.2000
<p>Name and mailing address of the IPEA/</p>  <p>European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+ 49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+ 49-89) 2399-4465</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>Buchet, A</p> <p>Telephone No. +49 89 2399 7401</p> 

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR99/00874

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments.):*

**Description, pages:**

1-27 as originally filed

**Claims, No.:**

1-21 received with the fax 09/06/2000

**Drawings, sheets:**

1/4-4/4 as originally filed

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:  
☐ the claims, Nos.:  
☐ the drawings, sheets:

3. ☐ The present report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated as follows (Rule 70.2(c)):

4. Additional observations, if necessary:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR99/00874

---

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

Novelty	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	
Inventive Step	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	
Industrial Applicability	Yes:	Claims	1-21
	No:	Claims	

**2. Citations and explanations** *see separate sheet*  
**see separate sheet**

**VIII. Certain observations in the international application**

The following observations on the clarity of the claims, descriptions, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

**see separate sheet**

---

**With regard to point V**

**Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

Reference is made to the following documents:

D1: EP 0 293 207

D2: US 5,416,008

D3: Gene

Vol. 46, 1986, pp 103-112

- D1 presents a bacterial system for intensive production of tryptophan: it is a strain of *Escherichia coli* which lacks the TrpR repressor and the tryptophan-degrading enzyme TnaA, and which carries the tryptophan biosynthesis genes on a plasmid capable of overproducing these enzymes in response to entering into the stationary phase.

The production and selection of a strain of *E. coli* having an inactivated *tnaA* gene is described in column 5, l 48 to 58. However, in this case, it is an inactivation by chemical mutagenesis which is carried out directly on the chromosome, and the aim of which is to protect tryptophan as a product of interest and not as a corepressor.

- D2 proposes using cross-regulation between two interactive operons to strictly control the overproduction of a protein of interest in *E. coli*. The first construct carries a promoter which is repressed by an R1 repressor, and which governs the transcription of the gene encoding the protein to be overproduced, as well as that of a gene encoding an R2 repressor. This promoter is, for example, the tryptophan operon promoter of *E. coli* which is repressed by the TrpR repressor (column 4, l 41 to 45). The 2nd construct carries the R1 repressor gene under the control of a promoter which is repressed by R2. These constructs can be as plasmids or integrated into the chromosome.

- D3 uses the tryptophan operon promoter of *E. coli* to overproduce human  $\beta$ -interferon. In order to avoid, at the start of growth, "leaking" of this protein

which is toxic for the cell, the repression before induction is improved by transforming the recombinant cell with a plasmid carrying the TrpR repressor gene under the control of a weak constitutive promoter. The amount of repressor in the cell is thus increased, and the phenomenon of negative self-regulation is simultaneously ruled out.

- D2 and D3 propose to resolve the same technical problem as the present invention, namely, a very strict repression of the overproduction system before induction, which is particularly crucial when using an expression vector at high copy number, and for overproducing toxic proteins. However, they use different solutions, and give no indication which makes it possible to result in the present invention, i.e. in the use of the tryptophan operon promoter of *E. coli* coupled with the inactivation of the TnaA protein which is responsible for degrading the tryptophan corepressor.

- As a result of this, claims 1 to 21 appear to be novel and inventive, satisfying the conditions set out in Articles 33.2 PCT and 33.3 PCT, respectively.

**With regard to point VIII**

**Observations relating to the international application**

In order to rule out any ambiguity concerning the unitary appearance of the present invention, it is recommended to make reference in the method claim 1 to the construct which is the subject-matter of the independent claim 10.

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 339790/17469	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/00874	International filing date (day/month/year) 14 April 1999 (14.04.99)	Priority date (day/month/year) 14 April 1998 (14.04.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/71		
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>4</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 02 November 1999 (02.11.99)	Date of completion of this report 07 July 2000 (07.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/00874

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-27, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. 1-21, filed with the letter of 09 June 2000 (09.06.2000),  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Reference is made to the following documents:

D1: EP 0 293 207

D2: US 5 416 008

D3: Gene vol. 46, 1986, pages 103-112

- D1 presents a bacterial system enabling intensive production of tryptophan. It is a strain of *Escherichia coli* deprived of the TrpR repressor and the degradative enzyme of TnaA tryptophan, bearing the biosynthesis genes of tryptophan on a plasmid capable of overproducing said enzymes in response to entering the stationary phase. Achieving and selecting a strain of *E. coli* having an inactivated *TnaA* gene is described in column 5, lines 48-58. However, this case deals with inactivation via chemical mutagenesis carried out directly on the chromosome with the aim of protecting the tryptophan as a substance of interest rather than as a co-repressor.
- D2 proposes using cross-regulation of interacting operons to strictly control the overproduction of a protein of interest in *E. coli*. The first construct has a promoter, repressed by an R1 repressor, regulating the transcription of the gene coding the protein to be

overproduced as well as the protein of a gene coding an R2 repressor. Said promoter is, for example, that of the tryptophan operon of *E. coli* repressed by the TrpR repressor (column 4, lines 41-54). The second construction includes the R1 repressor gene under the control of a promoter repressed by R2. Said constructs can be plasmatic or integrated into the chromosome.

- D3 uses the tryptophan operon promoter of *E. coli* for overproducing the human interferon  $\beta$ . In order to prevent said protein, which is toxic for the cell, from "escaping" during the beginning of growth, repression before induction is improved by transforming the recombinant cell into a plasmid including the TrpR repressor gene under the control of a weak constituent promoter. The amount of repressor in the cell thus increases while the phenomenon of negative autoregulation simultaneously diminishes.

- D2 and D3 attempt to solve the same technical problem as the present invention, namely that of strictly repressing the overproduction system before induction, which is particularly crucial in the case of using an expression vector with a high number of copies for overproducing toxic proteins. However, said documents use different solutions and do not give any indication leading to the present invention, namely, using the tryptophan operon promoter of *E. coli* coupled with the inactivation of the TnaA protein responsible for degrading the tryptophan co-repressor.

- For this reason, since claims 1 through 21 appear to be novel and inventive, they meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3), respectively.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

ational application No.

PCT/FR 99/00874

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

To avoid any ambiguity regarding the unity of the present invention, it is suggested that the construct that is the subject matter of independent claim 10 be referred to in method claim 1.

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

REC'D 11 JUL 2000

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire 339790/17469	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/00874	Date du dépôt international (jour/mois/année) 14/04/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 14/04/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/71		
Déposant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 4 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 02/11/1999	Date d'achèvement du présent rapport 07.07.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Buchet, A N° de téléphone +49 89 2399 7401 

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00874

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-27                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-21                      reçue(s) avec télécopie du      09/06/2000

**Dessins, feuilles:**

1/4-4/4                      version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins,              feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/00874

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-21
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-21
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-21
	Non : Revendications

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: EP 0 293 207

D2: US 5,416,008

D3: Gene

Vol. 46, 1986, pp 103-112

- D1 présente un système bactérien permettant une production intensive du tryptophane: il s'agit d'une souche d'*Escherichia coli* dépourvue du répresseur TrpR et de l'enzyme dégradative du tryptophane TnaA, portant les gènes de biosynthèse du tryptophane sur un plasmide capable de surproduire ces enzymes en réponse à l'entrée en phase stationnaire.

L'obtention et la sélection d'une souche d'*E. coli* présentant un gène *tnaA* inactivé est décrit colonne 5, l 48-58. Cependant, dans ce cas, il s'agit d'une inactivation par mutagénèse chimique effectuée directement sur le chromosome et qui a pour but de protéger le tryptophane en tant que produit d'intérêt et non en tant que corépresseur.

- D2 propose d'utiliser une régulation croisée entre deux opérons interactifs pour contrôler strictement la surproduction d'une protéine d'intérêt chez *E. coli*. La première construction porte un promoteur, réprimé par un répresseur R1, gouvernant la transcription du gène codant la protéine à surproduire ainsi que celle d'un gène codant un répresseur R2. Ce promoteur est par exemple celui de l'opéron tryptophane d'*E. coli* réprimé par le répresseur TrpR (colonne 4, l 41-54). La 2ème construction porte le gène du répresseur R1 sous le contrôle d'un promoteur réprimé par R2. Ces constructions peuvent être plasmidiques ou intégrées dans le chromosome.

- D3 utilise le promoteur de l'opéron tryptophane d'*E. coli* pour surproduire l'interféron humain  $\beta$ . Afin d'éviter en début de croissance des "fuites" de cette protéine toxique pour la cellule, la répression avant induction est améliorée en transformant la cellule recombinante par un plasmide portant le gène du répresseur TrpR sous le contrôle



d'un promoteur constitutif faible. La quantité de répresseur dans la cellule se trouve ainsi augmentée et le phénomène d'autorégulation négative simultanément écarté.

- D2 et D3 se proposent de résoudre le même problème technique que la présente invention, à savoir une répression très stricte du système de surproduction avant induction, particulièrement cruciale dans le cas de l'utilisation d'un vecteur d'expression à haut nombre de copies et pour la surproduction de protéines toxiques. Cependant, ils utilisent des solutions différentes et ne donnent aucune indication permettant d'aboutir à la présente invention, c'est à dire à l'utilisation du promoteur de l'opéron tryptophane d'*E. coli* couplée à l'inactivation de la protéine TnaA responsable de la dégradation du corépresseur tryptophane.

- Il en résulte que les revendications 1 à 21 apparaissent comme étant nouvelles et inventives, satisfaisant aux conditions énoncées aux Articles 33.2 PCT et 33.3 PCT, respectivement.

#### **Concernant le point VIII**

#### **Observations relatives à la demande internationale**

Pour écarter toute ambiguïté concernant l'aspect unitaire de la présente invention, il est recommandé de faire référence dans la revendication de procédé 1 à la construction faisant l'objet de la revendication indépendante 10.

M 09.06.00

28

### REVENDICATIONS

1. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt dont le gène est placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron tryptophane P<sub>trp</sub> caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la transformation d'une cellule procaryote par un vecteur contenant une séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte, et l'intégration de ladite séquence dans l'ADN de ladite cellule hôte ; et précédemment, postérieurement ou simultanément, l'introduction dans ladite cellule procaryote de tout, ou une partie, de la séquence d'un promoteur suivie en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur P<sub>trp</sub> ou son produit de transcription ;
- b) la transformation de ladite cellule procaryote par un vecteur contenant un gène codant pour ladite protéine recombinante d'intérêt ;
- c) la culture de ladite cellule transformée dans un milieu de culture permettant l'expression de la protéine recombinante ; et
- d) la récupération de la protéine recombinante à partir du milieu de culture ou ladite cellule transformée.

2. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon la revendication 1, dans lequel la séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA est introduite dans l'ADN de la cellule hôte procaryote selon la méthode d'intégration chromosomique décrite dans l'exemple 1 ou 2.

3. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon la revendication 1 ou 2, dans lequel ladite séquence nucléique introduite dans ladite cellule hôte est introduite sans autre élément d'ADN qui permettrait d'y associer un avantage sélectif.

4. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel ladite séquence nucléique introduite dans ladite cellule hôte est introduite au locus de l'opéron tryptophanase.

M 09.08.00  
29

5. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit procédé comprend en outre entre l'étape a) et b), une étape de résolution et de criblage.

6. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéine agissant négativement sur le promoteur P<sub>trp</sub> ou son produit de transcription est obtenue par tout moyen permettant d'exercer un effet inhibiteur ou activateur sur ledit promoteur.

7. Procédé de production selon la revendication 6, dans lequel l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur P<sub>trp</sub> ou son produit de transcription est obtenue soit :

- a) par le choix d'une source de carbone appropriée dans le milieu de culture ; soit
- b) par l'ajout de tryptophane dans le milieu de culture ; ou
- c) par une combinaison de a) et b).

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la cellule hôte procaryote est une bactérie Gram négative.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la cellule hôte procaryote est *E. Coli*.

10. Construction première utilisée pour transformer une cellule hôte procaryote susceptible d'être transformée par une deuxième construction pour l'expression d'un gène codant pour une protéine recombinante d'intérêt placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron tryptophane P<sub>trp</sub> dans une cellule hôte procaryote, caractérisée en ce que la construction première comprend une séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte.

11. Construction première selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre en amont de ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte, tout ou partie de la séquence nucléique du promoteur P<sub>tna</sub> de l'opéron tryptophanase.

11 09.06.00  
30

12. Construction première selon la revendication 10 ou 11, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte comprend un fragment muté de la séquence codante de ladite tryptophanase TnaA.

5 13. Construction première selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit fragment muté est obtenu par l'insertion d'un codon stop à une position telle que la séquence du fragment muté ainsi obtenu code pour un fragment protéique dépourvu d'activité tryptophanase.

10 14. Construction première selon la revendication 12 ou 13, caractérisée en ce que ledit fragment muté est un fragment muté de la séquence codante de la tryptophanase TnaA de ladite cellule hôte.

15 15. Construction première selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte est la séquence nucléique comprenant tout ou partie de la séquence d'un promoteur suivie en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp ou son produit de transcription.

20 16. Construction première selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp est tout, ou une partie permettant une activité promotrice, du promoteur Ptna de l'opéron tryptophanase.

25 17. Construction première selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp est la séquence codant pour l'apoprésseur TrpR de l'opéron tryptophane ou un de ses fragments biologiquement actifs.

18. Vecteur contenant une construction première selon l'une des revendications 10 à 17.

30 19. Vecteur selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pMAK705 [tnaAt] tel que défini dans l'exemple 1 ou du vecteur pMAK705 [Ptna : trpR : 3'tna] tel que défini dans l'exemple 2.

N 09.06.00

31

20. Cellule hôte procaryote transformée par un vecteur selon l'une des revendications 18 à 19.

21. Cellule hôte procaryote selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'*E. coli*.

5

# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

AHNER, F.  
CABINET REGIMBEAU  
26, Avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE

[stamp]

## PCT

### NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)	07.07.2000
-------------------------------------	------------

Applicant's or agent's file reference 339790/17469	IMPORTANT NOTIFICATION
---	------------------------

International application No. PCT/FR99/00874	International filing date (day/month/year) 14/04/1999	Priority date (day/month/year) 14/04/1998
---	--	--

Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.
---

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39.1) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/	Authorized officer:
---------------------------------------	---------------------



European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. (+ 49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d  
Fax: (+ 49-89) 2399-4465



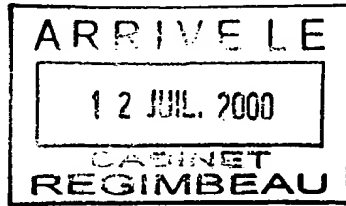
Christensen, J  
Telephone No. +49 89 2399-8052

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE  
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

PCT

Destinataire:

AHNER.F.  
CABINET REGIMBEAU  
26, Avenue Kléber  
F-75116 Paris  
FRANCE



NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU  
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE  
INTERNATIONAL  
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition  
(jour/mois/année) 07.07.2000

Référence du dossier du déposant ou du mandataire  
339790/17469

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.  
PCT/FR99/00874

Date du dépôt international (jour/mois/année)  
14/04/1999

Date de priorité (jour/mois/année)  
14/04/1998

Déposant  
PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.

2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.

3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen  
préliminaire international



Office européen des brevets  
D-80298 Munich  
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Christensen, J

Tél. +49 89 2399-8052



- a) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC - 3' (SEQ ID NO. 1)
- b) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC AGCACAACGC  
GCCUGUCACC GGAUGUGUUU UCCGGUCUGA UGAGUCCGUG  
AGGACGAAAC AGG - 3' (SEQ ID NO. 2)
- c) 5' - AUUCAGUACG AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU  
UUUACGUGAA CUU - 3' (SEQ ID NO. 3)
- d) 5' - AUUCAGUACG AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU  
UUUACGUGAA CUUAGCACAA CGCGCCUGUC ACCGGAUGUG  
UUUCCGGUC UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACAGG - 3' (SEQ ID NO. 4)
- e) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC AUUCAGUACG  
AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU UUUACGUGAA CUU - 3' (SEQ ID NO. 5)
- f) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC AUUCAGUACG  
AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU UUUACGUGAA  
CUUAGCACAA CGCGCCUGUC ACCGGAUGUG UUUCCGGUC  
UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACAGG - 3' (SEQ ID NO. 6)
- g) 5' - CUUCGCGUCC UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACGGCUUCC - 3' (SEQ ID NO. 7)
- h) 5' - CUUCGCGUCC UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACGGCUUCC  
AGCACAACGC GCCUGUCACC GGAUGUGUUU UCCGGUCUGA  
UGAGUCCGUG AGGACGAAAC AGG - 3' (SEQ ID NO. 8)

Another aspect of the invention relates to a  
5 vector containing a construct according to the  
invention.

Preferably, the vector according to the  
invention is characterized in that it is the vector  
pMAK705[tnaAt] or the vector  
10 pMAK705[Ptna::trpR::3'tna].

The invention also relates to a prokaryotic  
host cell, preferably a bacterium of the E. coli  
species, transformed with a vector according to the  
invention.

15 In another aspect, a subject of the invention  
is a method for producing recombinant protein in a host  
cell using a construct according to the invention.

A subject of the invention is also a method for  
producing a recombinant protein of interest according  
20 to the invention, in which said construct is introduced  
into the DNA of the prokaryotic host cell.

SUBSTITUTE SHEET



Table 1: Nature of the mutations carried by ICONE 100 and ICONE 200

Mutant name	Nature of element (b)
ICONE 100	Coding sequence of <i>tnaA</i> interrupted at position +221 by a stop codon and an <i>XbaI</i> restriction site
ICONE 200	Coding sequence of the <i>trpR</i> gene encoding the <i>P<sub>trp</sub></i> aporepressor

5 Example 1: Construction of the mutant ICONE 100

A DNA fragment, marked *tnaAT*, is amplified by PCR. It stretches from position -275 to position +1054 with respect to the first nucleotide of the coding sequence of *tnaA*. This fragment, which overlaps *P<sub>tna</sub>* promoter and *tnaA*, is amplified by two-part PCR reaction. Part I stretches from position -275 to position +220. It is amplified with the aid of the oligonucleotides *Trp5* (sense) and *Trp2* (antisense), the sequence of which is:

15

*Trp5* : 5' - CGGGATCCGTGTGACCTCAAAATGGTT - 3'

(SEQ ID NO. 9)

BamHI

*Trp2* : 3' - CTACGCGCCGCTGCTTCGGATTAGATCTCG - 5'

(antisense)

stop *XbaI* (SEQ ID NO. 10)

20

Part II is located in the coding sequence of *tnaA*, immediately 3' of part I. It stretches from position +221 to position +1054. It is amplified with the aid of the oligonucleotides *Trp3* and *Trp4*:

25

*Trp3* : 5' - CGTCTAGACAGCGGCAGTCGTAGCTAC - 3'

(SEQ ID NO. 11)

*XbaI*

*Trp4* : 3' - CCTTCTCTAACCGCAACAGTTCGAACG - 5'

(antisense)

HindIII (SEQ ID NO. 12)

30

SUBSTITUTE SHEET

The presence of *tnaA*-inactivating mutation is confirmed in two different ways: firstly, a PCR amplification with the aid of the oligonucleotides Trp5 and Trp4, followed by a digestion with XbaI shows that the restriction site, which is absent in *E. coli* RV308, is present in the *tnaA* gene of the mutants; next, by culturing the mutants in a tryptophan-rich medium, followed by the indole test (adding the Kovacs reagent to the culture medium), it is shown that the mutants have not generated indole, whereas the strain RV308 of origin produces indole under the same conditions. It is deduced therefrom that the mutation introduced leads to a loss of tryptophanase activity.

One clone is selected for the purpose of conservation in frozen form. It is named ICONE 100.

#### Example 2: Construction of the mutant ICONE 200

A DNA fragment is constructed in vitro by PCR amplification of three subunits.

The first subunit located in the *Ptna* promoter stretches from position -511 to position +3 with respect to the first nucleotide of the coding sequence of *tnaA*. It is amplified using the oligonucleotides TrpR1 (biotinylated in the 5' position) and TrpR2:

TrpR1: 5'-CTGGATCCCTGTCAGATGCGCTTCGC-3'

(SEQ ID NO. 15)

BamHI

TrpR2: 3'-CTTCCTAATACATTACCGGGTTG-5'

(antisense)

(SEQ ID NO. 16)

The second subunit corresponds to the coding sequence of the *trpR* gene of *E. coli*. It is amplified using the oligonucleotides TrpR3 and TrpR4 (biotinylated in the 5' position):

SUBSTITUTE SHEET

The so-called resolution phase consists in promoting the excision of the vector through a mechanism of recombination between repeated sequences present on the chromosome. Some clones isolated at 44°C are cultured in LB liquid medium + 20 µg/ml CMP at 30°C for three days, renewing the medium regularly. The suspensions are then diluted, plated out on LB agar medium + 20 µg/ml CMP, and incubated at 30°C until separate colonies appear. Several tens of colonies are subcultured in duplicate on LB agar medium + 20 µg/ml CMP at 30°C and 44°C. The colonies which do not develop at 44°C are selected and screened with a PCR reaction which indicates whether resolving the vector has conserved the stop codon and the XbaI site at the *tna* locus. The oligonucleotides used are Trp6 (sense) and Trp7 (antisense), which are homologous to the desired mutation and to a portion of the *tnaA* terminator, respectively:

Trp6 : 5' - CGACGAAGCCTAATCTAGA - 3'

stop XbaI (SEQ ID NO. 13)

Trp7 : 3' - CCGATATTCCTACAATCGG - 5'

(antisense) (SEQ ID NO. 14)

Out of eighteen screened clones, nine give an amplification fragment with the expected size indicating the presence of the stop codon followed by the XbaI site in the *tnaA* gene. The other nine clones do not give an amplification product, probably because the resolution step has restored on the chromosome the unmutated *tnaA* gene. Among the nine positive clones, four are sampled and subjected to a clearing out of the plasmid by successive subculturing in the absence of selection pressure. After culturing for a few days, clones are obtained which have again become sensitive to chloramphenicol.

SUBSTITUTE SHEET

TrpR3 : 5' - GTAATGGCCCAACAATCACC - 3'

start (SEQ ID NO. 17)

TrpR4 : 3' - CACAACGACTTTTCGCTAACTGACGTCAG - 5'

(antisense)

PstI

(SEQ ID NO. 18)

5

The third subunit corresponds to the sequence located immediately 3' of the coding sequence of *tnaA*. It contains the intergenic region of the *tna* operon and a portion of the *tnaB* gene encoding tryptophan permease. It is amplified using the oligonucleotides TrpR5 and TrpR6:

TrpR5 : 5' - CGCTGCAGTTAATACTACAGAGTGG - 3'

PstI

(SEQ ID NO. 19)

15

TrpR6 : 3' - CCAGCTAATGAGGTAAAGTTCTGAAC - 5'

(antisense)

HindIII

(SEQ ID NO. 20)

The amplified fragments are purified according to the GeneClean method (Bio101, Jolla, CA, USA).

The subunits I and II are fused in the following way. In two separate tubes, each subunit is incubated with 30 µl of streptavidin-labeled beads (Dynabeads, DYNAL, Norway). After 20 min at 37°C and 5 min at room temperature, the bound DNA is denatured with 50 µl of 0.15 M NaOH. The single-stranded DNAs recovered in each supernatant are mixed in equal parts and subjected to a hybridization reaction and an extension reaction in the presence of Taq polymerase (AmpliTaq Gold, CETUS, USA) according to five PCR cycles. The reaction product is amplified in a PCR reaction with the aid of the oligonucleotides TrpR1 and TrpR4.

The GeneClean-purified amplification product is digested with BamHI and PstI. The fragment thus isolated is cloned into the vector pRIT28 to give pRIT28[Ptna::trpR], and then sequenced.

The subunit III is digested with the enzymes PstI and HindIII, then cloned into pRIT28 to give

SUBSTITUTE SHEET

pRIT28[3'tna], and then the sequence is verified by DNA sequencing (ABI 373A, Perkin Elmer, USA).

The vector pRIT28[Ptna::trpR] is digested with the enzymes PstI and HindIII, and then ligated in the presence of the subunit III, itself isolated from pRIT28[3'tna] by PstI/HindIII double digestion. The resulting vector is named pRIT28[Ptna::trpR::3'tna]. The insert is transferred into pMAK705 after double digestion with the enzymes BamHI and HindIII. The resulting plasmid is named pMAK705[Ptna::trpR::3'tna].

The integration of the Ptna::trpR::3'tna fusion at the tna locus of *E. coli* RV308 is carried out under conditions similar to those described in Example 1. Briefly, the strain is transformed with the vector pMAK705[Ptna::trpR::3'tna], and then subjected to the integration and resolution steps.

The screening of the colonies at the end of resolution uses conditions which are slightly different to those in Example 1. The tna locus is amplified by PCR using the oligonucleotides TrpR11 and TrpR7:

TrpR11: 5' - GGGCAGGTGAACTGCTGGCG - 3' (SEQ ID NO. 21)

TrpR7: 3' - GGTGCCGTTATAAGGGTCGGAC - 5' (SEQ ID NO. 22)  
(antisense)

TrpR11 hybridizes with the Ptna sequence upstream (5') of TrpR1, and TrpR7 hybridizes with the *tnaB* sequence downstream (3') of TrpR6. The amplification product has a different size depending on whether the gene placed downstream of Ptna is *tnaA* (situation encountered in RV308) or *trpR* (desired situation in the mutants). A colony which possesses *trpR* at the *tna* locus is conserved and named ICONE 200. An analysis of its chromosomal sequence shows that it possesses the *trpR* gene immediately downstream of the Ptna promoter. Culturing in the presence of tryptophan confirms the absence of indole formation, which is a logical consequence of the loss of the *tnaA* gene.

SUBSTITUTE SHEET

This example describes the behavior of the strains RV308 and ICONE 200 in culture when they are transformed with a vector carrying, downstream of the tryptophan promoter, the gene of a toxic protein. By way of example, and so as to illustrate the invention, the gene of interest is the one encoding the poliovirus 2B protein. It has been described that the overexpression of this protein modifies the membrane permeability in bacteria (Lama et al., 1992) and in eukaryotic cells (Aldabe et al., 1996), which makes it a model of choice for studying the consequences of leaking of expression in *E. coli*.

PO2.1            5' - GCGAAATTCTGGCATCACCAATTACATAG - 3'  
   (EcoRI) (SEQ ID NO. 23)  
 (sense)

PO2.2I         5' - GCAAGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTGCTTGATGACATAA  
   (HindIII) (SEQ ID NO. 24)  
 (antisense)    GGTATC-3'

The vector pVA-polio2B is introduced into the *E. coli* RV308 and ICONE 200 bacteria by transformation. A recombinant clone of each construct is then cultured under conditions which are similar to those described in Example 4.

SUBSTITUTE SHEET

4/PRTS.

# NOUVELLES CONSTRUCTIONS POUR L'EXPRESSION CONTROLEE DE PROTEINES RECOMBINANTES DANS DES CELLULES PROCARYOTES.

L'invention comprend une nouvelle construction pour l'expression d'un gène  
5 codant pour une protéine recombinante d'intérêt placé sous le contrôle du promoteur de  
l'opéron tryptophane P<sub>trp</sub> dans une cellule hôte procaryote, caractérisée en ce que la  
construction comprend une séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour  
une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite  
cellule hôte, des vecteurs contenant ladite construction et les cellules hôtes transformées  
10 par lesdits vecteurs. L'invention a également pour objet les procédés de production  
desdites protéines recombinantes utilisant ces nouvelles constructions.

La présente invention s'applique de manière générale à la production de  
protéines ou de polypeptides recombinants par des méthodes dites de l'ADN  
recombinant. Plus particulièrement, la présente invention concerne la production de  
15 protéines ou de polypeptides recombinants par des cellules hôtes transformées de type  
bactérien et dont l'expression est dirigée ou est sous le contrôle du promoteur / opérateur  
P<sub>trp</sub> de l'opéron tryptophane (Nichols & Yanofsky, 1983).

*Escherichia coli* (*E. coli*) est l'organisme le plus couramment utilisé et le mieux  
caractérisé dans un but de production de protéines recombinantes. Différents systèmes  
20 d'expression sont employés dans *E. coli* et, parmi eux, le promoteur P<sub>trp</sub> de l'opéron  
tryptophane est considéré comme l'un des plus forts (Yansura & Bass, 1997).

Cependant, tous les gènes recombinants ne sont pas exprimés avec la même  
efficacité par *E. coli*. Il a été décrit et observé que l'accumulation d'une protéine  
recombinante produite lors de la culture de cellules hôtes transformées pouvait  
25 rapidement conduire à une instabilité plasmidique, à une diminution voire même un  
arrêt de la croissance cellulaire et à une diminution du rendement global en produit  
recombinant. Dans ce cas, il est important de disposer d'un système d'expression  
contrôlée et régulée permettant de diviser le procédé de production en deux phases, une  
première dite de croissance cellulaire où l'activité du promoteur est minimale, suivie  
30 d'une phase dite d'induction ou de dérépression privilégiant l'expression et  
l'accumulation de la protéine recombinante.

P<sub>trp</sub>, le promoteur de l'opéron tryptophane d'*E. coli*, est adapté à la production de protéines recombinantes du fait de son caractère inductible. La répression au niveau de l'opérateur de P<sub>trp</sub> est assurée par le produit du gène régulateur *trpR* lorsque ce produit, également nommé aporépresseur *trp*, est lié au tryptophane (co-répresseur). L'absence de tryptophane rend la protéine TrpR incapable de se lier à l'opérateur, provoquant ainsi une dérégulation de l'opéron tryptophane. Divers exemples d'expression de gènes hétérologues sous le contrôle de P<sub>trp</sub> montrent que la fuite d'expression y est trop importante pour permettre la production, dans des conditions satisfaisantes de protéines recombinantes, notamment celles qui sont toxiques pour la cellule (Yansura et Henner, 1990).

La protéine régulatrice TrpR est soumise à un mécanisme d'auto-régulation (Kelley & Yanofsky, 1982) et sa concentration tend vers une valeur moyenne de 120 molécules par cellule d'*E. coli* K-12 en présence d'un excès de tryptophane exogène (Gunsalus, Gunsalus Miguel & Gunsalus, 1986). Cette concentration, si elle est suffisante pour réguler correctement l'activité de l'unique promoteur chromosomique P<sub>trp</sub>, peut s'avérer limitante face à plusieurs dizaines de vecteurs contenant le même promoteur. Quant au tryptophane, il peut aussi être un facteur limitant même s'il est apporté en excès dans le milieu de culture. Il existe en effet chez *E. coli* une activité tryptophanase codée par le gène *tnaA* et capable de dégrader le tryptophane en indole, le détournant ainsi de sa fonction régulatrice (Snell, 1975). De plus, la tryptophanase est inductible par le tryptophane, ce qui rend vaine toute tentative de compenser ce phénomène de dégradation par une augmentation de l'apport en tryptophane.

Différentes approches visant à contrôler au mieux la fuite d'expression ont été envisagées et décrites. Cependant, certaines ont l'inconvénient d'être seulement applicables à l'échelle du laboratoire (Hasan & Szybalski, 1995 ; Suter-Crazzolara & Unsicker, 1995) ou de diminuer le rendement en produit recombinant (Stark, 1987).

Par conséquent, il existe aujourd'hui un grand besoin à développer un système d'expression de protéines recombinantes d'intérêt contrôlée et utilisable à grande échelle et permettant en particulier de contrôler la fuite d'expression. Ceci est justement l'objet de la présente invention.

L'invention concerne de nouvelles constructions basées sur le système d'expression P<sub>trp</sub> qui lorsqu'elles sont introduites dans une cellule hôte procaryote, de



préférence de type bactérien, permettent de réduire l'expression résiduelle de gènes recombinants en début de culture, ces nouvelles constructions apportant un contrôle amélioré de la synthèse de protéines recombinantes.

La présente invention a pour objet une construction pour l'expression d'un gène  
5 codant pour une protéine recombinante d'intérêt placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron tryptophane P<sub>trp</sub> dans une cellule hôte procaryote, caractérisée en ce que la construction comprend une séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite  
10 cellule hôte.

Par protéine recombinante d'intérêt, on entend désigner toutes protéines, polypeptides ou peptides obtenus par recombinaison génétique, et susceptibles d'être utilisés dans des domaines tels que celui de la santé humaine ou animal, de la cosmétologie, de la nutrition humaine ou animale, de l'agro-industrie ou de l'industrie chimique. Parmi ces protéines d'intérêt on peut citer en particulier mais sans s'y limiter :

15 - une cytokine et notamment une interleukine, un interféron, un facteur de nécrose tissulaire et un facteur de croissance et notamment hématopoïétique (G-CSF, GM-CSF), une hormone telle que l'hormone de croissance humaine ou l'insuline, un neuropeptide,

- un facteur ou cofacteur impliqué dans la coagulation et notamment le facteur  
20 VIII, le facteur von Willebrand, l'antithrombine III, la protéine C, la thrombine et l'hirudine,

- une enzyme et notamment la trypsine, une ribonucléase et la  $\beta$ -galactosidase,

- un inhibiteur d'enzyme telle que l' $\alpha$ 1 anti-trypsine et les inhibiteurs de  
protéases virales,

25 - une protéine capable d'inhiber l'initiation ou la progression de cancers, tels que les produits d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple le gène P53,

- une protéine capable de stimuler une réponse immunitaire ou un anticorps, telle que par exemple les protéines, ou leurs fragments actifs, de la membrane externe de bactérie Gram négatif, en particulier les protéines OmpA de Klebsiella ou la protéine G  
30 du virus respiratoire syncytial humain,

- une protéine capable d'inhiber une infection virale ou son développement, par exemple les épitopes antigéniques du virus en cause ou des variants altérés de protéines virales susceptibles d'entrer en compétition avec les protéines virales natives,

5 - une protéine susceptible d'être contenue dans une composition cosmétique telle que la substance P ou une superoxyde dismutase,

- une protéine alimentaire,

- une enzyme capable de diriger la synthèse de composés chimiques ou biologiques, ou capable de dégrader certains composés chimiques toxiques, ou encore

10 - toute protéine ayant une toxicité vis-à-vis du micro-organisme qui la produit, en particulier si ce micro-organisme est la bactérie *E. coli*, comme par exemple; mais sans s'y limiter, la protéase du virus VIH-1, la protéine ECP (ECP pour "Eosinophile Cationic Protein") ou les protéines 2B et 3B du poliovirus.

Par séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule  
15 hôte, on entend désigner une séquence nucléique capable de modifier ledit gène de telle sorte que cette modification entraîne la perte de l'activité tryptophanase de ladite cellule hôte, le produit d'expression dudit gène modifié étant incapable de dégrader le tryptophane en indole, le détournant ainsi de sa fonction régulatrice. Parmi lesdites séquences nucléiques capables d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA  
20 lorsqu'une desdites séquences nucléiques est introduite dans ladite cellule hôte, on préfère une séquence nucléique codant pour une tryptophanase TnaA inactivée obtenue par mutation telle que par substitution, insertion et/ou délétion d'au moins un nucléotide de la séquence nucléique codant pour une tryptophanase TnaA active.

L'invention comprend une construction selon l'invention, caractérisée en ce que  
25 la cellule hôte procaryote est une bactérie Gram négative, de préférence appartenant à l'espèce *E. coli*.

L'invention concerne également une construction selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre en amont de ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence  
30 nucléique est introduite dans ladite cellule hôte, tout ou partie de la séquence nucléique du promoteur P<sub>tna</sub> de l'opéron tryptophanase.

De préférence, l'invention est relative à une construction selon l'invention, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte comprend un fragment muté de la séquence codante de ladite tryptophanase TnaA.

De manière préférée, l'invention est relative à une construction selon l'invention, caractérisée en ce que ledit fragment muté est obtenu par l'insertion d'un codon stop à une position telle que la séquence du fragment muté ainsi obtenu code pour un fragment protéique dépourvu d'activité tryptophanase.

De manière tout aussi préférée, l'invention est relative à une construction selon l'invention, caractérisée en ce que ledit fragment muté est un fragment muté de la séquence codante de la tryptophanase TnaA de ladite cellule hôte.

Pour ce qui concerne la séquence nucléique codant pour la tryptophanase TnaA de *E. coli*, et à son promoteur Ptna, on se référera dans la présente description à la séquence publiée par Deeley et Yanofsky (1981).

Pour ce qui concerne les séquences nucléiques codant pour le promoteur/opérateur Ptrp de l'opéron tryptophane, on se référera à la séquence publiée par Yanofsky et al. (1981).

L'invention concerne également une construction selon l'invention, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte comprend une séquence nucléique comprenant tout ou partie de la séquence d'un promoteur suivie en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp.

De préférence, l'invention est relative à une construction selon l'invention, caractérisée en ce que ledit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp est tout ou partie du promoteur Ptna de l'opéron tryptophanase d'*E. coli*.

De manière également préférée, l'invention comprend une construction selon l'invention, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp, est la séquence codant pour l'apoprésseur TrpR de l'opéron tryptophane d'*E. coli* ou

un de ses fragments biologiquement actifs telle que celle décrite par Gunsalus et Yanofsky (1980).

On entend désigner par une séquence nucléique comprenant tout ou partie de la séquence d'un promoteur, une séquence nucléique comprenant toute la séquence d'un promoteur, ou un de ses fragments biologiquement actifs, capable de diriger ou de contrôler l'expression d'un gène qui lui est relié de manière fonctionnelle.

On entendra désigner dans la présente description par fragment biologiquement actif d'un promoteur, toute séquence d'un fragment dudit promoteur, lequel fragment est capable de diriger ou de contrôler l'expression du gène situé en aval dudit fragment, ledit gène étant relié de manière fonctionnelle audit fragment.

On entendra désigner dans la présente description par fragment biologiquement actif de l'aporépresseur TrpR de l'opéron tryptophane, tout fragment dudit aporépresseur ayant conservé son activité répresseur.

Par séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique agissant négativement sur le promoteur Ptrp, on préfère les ribonucléotidiques choisis parmi les séquences suivantes :

- a) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC - 3'
- b) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC AGCACAACGC  
GCCUGUCACC GGAUGUGUUU UCCGGUCUGA UGAGUCCGUG  
AGGACGAAAC AGG - 3'
- c) 5' - AUUCAGUACG AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU  
UUUACGUGAA CUU - 3'
- d) 5' - AUUCAGUACG AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU  
UUUACGUGAA CUUAGCACAA CGCGCCUGUC ACCGGAUGUG  
UUUCCGGUC UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACAGG - 3'
- e) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC AUUCAGUACG  
AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU UUUACGUGAA CUU - 3'
- f) 5' - AUUCGCGUCU ACGGCUUCAU CGUGUUGCGC AUUCAGUACG  
AAAAUUGCUU UCAUAAUUCU AGAUACCCUU UUUACGUGAA  
CUUAGCACAA CGCGCCUGUC ACCGGAUGUG UUUCCGGUC  
UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACAGG - 3'
- g) 5' - CUUCGCGUCC UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACGGCUUCC - 3'

h) 5' - CUUCGCGUCC UGAUGAGUCC GUGAGGACGA AACGGCUUCC  
AGCACAACGC GCCUGUCACC GGAUGUGUUU UCCGGUCUGA  
UGAGUCCGUG AGGACGAAAC AGG - 3'.

Un autre aspect de l'invention concerne un vecteur contenant une construction  
5 selon l'invention.

De manière préférée, le vecteur selon l'invention est caractérisé en ce qu'il s'agit  
du vecteur pMAK705[tnaAt] ou du vecteur pMAK705[Ptna::trpR::3'tna].

L'invention concerne également une cellule hôte procaryote, de préférence une  
bactérie de l'espèce *E. coli*, transformée par un vecteur selon l'invention.

10 Sous un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé de production de  
protéine recombinante dans une cellule hôte utilisant une construction selon l'invention.

L'invention a également pour objet un procédé de production d'une protéine  
recombinante d'intérêt selon l'invention, dans lequel ladite construction est introduite  
dans l'ADN de la cellule hôte procaryote.

15 On préfère un procédé de production de protéines recombinantes selon  
l'invention, dans lequel ladite construction est introduite dans l'ADN de la cellule hôte  
procaryote par un vecteur selon l'invention, de préférence selon la méthode d'intégration  
chromosomique décrite dans l'exemple 1 ou 2.

L'invention a en outre pour objet un procédé de production de protéines  
20 recombinantes selon l'invention, dans lequel ladite construction est introduite sans autre  
élément d'ADN qui permettrait d'y associer un avantage sélectif.

De manière préférée, l'invention comprend un procédé de production d'une  
protéine recombinante d'intérêt selon l'invention, dans lequel ladite construction est  
introduite au locus de l'opéron tryptophanase d'*E. coli*, de préférence au locus du gène  
25 *tna*, mieux encore au locus du gène *tnaA*.

On préfère un procédé de production de protéines recombinantes d'intérêt selon  
l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la transformation d'une cellule procaryote par un vecteur selon  
l'invention, et l'intégration de ladite construction dans l'ADN de ladite cellule hôte ;

30 b) la transformation de ladite cellule procaryote par un vecteur contenant un  
gène codant pour ladite protéine recombinante d'intérêt ;

c) la culture de ladite cellule transformée dans un milieu de culture permettant l'expression de la protéine recombinante ; et

d) la récupération de la protéine recombinante à partir du milieu de culture ou de ladite cellule transformée.

5 L'invention a en outre pour objet un procédé de production de protéines recombinantes d'intérêt selon l'invention, caractérisé en ce que ledit procédé comprend en outre entre l'étape a) et b) du procédé ci-dessus, une étape de résolution et de criblage.

10 L'invention est relative en outre à un procédé de production de protéines recombinantes d'intérêt selon l'invention, dans lequel le contrôle de l'expression des protéines recombinantes avant induction du promoteur Ptrp est obtenu par l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp selon l'invention.

15 Enfin, l'invention comprend également un procédé de production selon l'invention, dans lequel l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp selon l'invention est obtenue par tout moyen permettant d'exercer un effet inhibiteur ou activateur sur ledit promoteur.

20 De préférence, l'invention comprend un procédé de production selon l'invention, dans lequel l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp selon l'invention est obtenue soit :

a) par le choix d'une source de carbone appropriée dans le milieu de culture ; soit

25 b) par l'ajout de tryptophane dans le milieu de culture ; ou  
par une combinaison de a) et b).

30 Les systèmes de constructions, de vecteurs, les cellules hôtes procaryotes transformées par lesdits vecteurs ainsi que les procédés de l'invention décrits ci-dessus et qui seront exemplifiés dans les exemples ci-après ici entrent dans le cadre du contrôle de la production de protéines recombinantes dans des cellules procaryotes. Ils sont adaptés à l'expression de gènes homologues ou hétérologues placés en aval du promoteur/opérateur Ptrp. Deux mutants sont plus particulièrement décrits ci-après pour

illustrer l'invention. Ils portent les noms ICONE 100 et ICONE 200 (ICONE pour Improved Cells for Over- and Non-leaky Expression). Les modifications introduites dans la lignée ICONE présentent les caractéristiques suivantes :

- 1) elles sont intégrées dans le chromosome de l'hôte,
- 5 2) étant générées par une technique de mutagenèse dirigée, elles sont ciblées à un endroit unique de l'ADN bactérien, parfaitement connu puisqu'il s'agit de l'opéron *tna* situé à 83 min sur la carte physique du génome d'*E. coli* K-12. En cela, les conséquences sur le plan physiologique pour l'hôte sont parfaitement identifiées. En particulier, la possibilité que des fonctions cryptiques soient réactivées suite à l'intégration chromosomique - comme cela est suspecté dans le cas de la mutagenèse aléatoire - est écartée,

- 3) la technologie employée dans ces exemples pour l'intégration chromosomique (Hamilton et al. (1989)) exclut la possibilité que d'autres séquences s'insèrent dans l'ADN bactérien. Notamment, les mutants ne portent pas de gène de résistance à un antibiotique. Dans le cas où ils seraient utilisés à l'échelle industrielle, ils offrent au producteur et au législateur la garantie qu'ils n'auront pas d'avantage sélectif en cas de dissémination accidentelle dans l'environnement.

Selon un aspect de l'invention, un premier type de mutant ou cellule transformée nommé ICONE 100 est décrit, qui porte une mutation dans le gène *tnaA* entraînant une perte de l'activité tryptophanase. Le phénotype associé à cette mutation est l'absence de dégradation du tryptophane. Ce type de mutant, après transformation par un vecteur rapporteur et culture sur un milieu favorisant habituellement l'activité tryptophanase, s'avère supérieur à l'isolat dont il est issu en termes de contrôle de la répression par le tryptophane.

25 Selon un autre aspect de l'invention, un second type de mutant nommé ICONE 200 est décrit, qui porte une cassette d'expression du gène *trpR* sous le contrôle du promoteur de la tryptophanase *P<sub>tna</sub>*, intégrée au locus du gène *tnaA*. L'utilisation du locus *tna* comme cible pour l'intégration entraîne chez la bactérie hôte une perte de l'activité tryptophanase qui se traduit comme décrit précédemment par une incapacité à convertir le tryptophane en indole. Par ailleurs, la présence de la cassette *P<sub>tna</sub>::trpR* dans le chromosome confère à ce nouveau gène *trpR* les caractéristiques de *P<sub>tna</sub>*, c'est-à-dire une sensibilité à la répression catabolique (Isaacs, Chao, Yanofsky, & Saier,

1994 ; Botsford & DeMoss, 1971) et l'inductibilité par le tryptophane (Stewart & Yanofsky, 1985). Cette dernière propriété constitue une innovation dans laquelle le promoteur Ptrp plasmidique est contrôlé au niveau de la transcription par un promoteur chromosomique, Pt<sub>na</sub>, qui lui est antagoniste. De manière surprenante, après transformation par un vecteur d'expression et culture en fermenteur, ICONE 200 s'avère supérieur à l'isolat dont il est issu en termes de contrôle de la répression par le tryptophane.

Les bactéries présentant une des caractéristiques mentionnées ci-dessus sont utiles pour la production maîtrisée de molécules recombinantes. Aussi, la présente invention a également pour objet l'utilisation desdites bactéries transformées dans un procédé de production de protéines recombinantes.

Dans les exemples ci-dessous, l'avantage apporté par les deux mutants est clairement démontré en utilisant comme protéine recombinante la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli*.

Un autre aspect de l'invention réside dans les caractéristiques des mutations introduites. Celles-ci sont parfaitement définies, contrôlées sur le plan génétique et biochimique, ciblées au locus *tna* d'*E. coli* et exemptes de marqueur de sélection.

Les micro-organismes mutants ou transformés de l'invention sont construits à partir de procaryotes, plus précisément de bactéries Gram-négatives appartenant à l'espèce *Escherichia. coli*. Les propriétés du promoteur de l'opéron tryptophanase d'*E. coli* (inductible par le tryptophane, sensible à la répression catabolique) ont été utilisées pour diriger la synthèse transitoire d'un médiateur agissant négativement sur l'expression dirigée par Ptrp. Cependant, il est connu que d'autres espèces bactériennes, en particulier celles qui colonisent le tractus intestinal des animaux, sont capables de synthétiser une tryptophanase inductible par le tryptophane (Snell, 1975). Par conséquent, d'autres souches que *E. coli* conviennent pour pratiquer les méthodes décrites et y produire des protéines recombinantes.

Les exemples et les figures qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Légendes des figures :

**FIGURE 1 :** Cinétiques de croissance des souches RV308, ICONE 100 et ICONE 200 x pVA- $\beta$ gal.



DO 580 nm correspond à la mesure de la densité optique mesurée par spectrophotométrie.

**FIGURE 2 :** Cinétiques d'activité  $\beta$ -gal des souches RV308, ICONE 100 et ICONE 200 x pVA- $\beta$ gal.

- 5 Les bactéries transformées par un vecteur contenant le gène de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur P<sub>trp</sub> sont cultivées en fermenteur. L'activité  $\beta$ -galactosidase est mesurée par incubation d'un extrait cellulaire en présence d'ONPG (substrat spécifique de la  $\beta$ -galactosidase).

**FIGURE 3 :** Comparaison des cinétiques de croissance des souches E. coli RV308 et  
10 ICONE 200 transformées par le vecteur pVA-polio2B.

**FIGURES 4A et 4B :** Immuno-blot sur les extraits intracellulaires des cultures de RV308 et ICONE 200 transformées par le vecteur pVA-polio2B.

Figure 4A : RV308 x pVA-polio2B

Figure 4B : ICONE 200 x pVA-polio2B

- 15 **FIGURE 5 :** Analyse par SDS-PAGE de la protéine polio-2B purifiée par chromatographie d'affinité sur Nickel.

A : Expérience n° 2 : induction par 5  $\mu$ g/ml d'IAA lorsque la densité optique est égale à 32,5 ;

- B : Expérience n° 1 : induction par 25  $\mu$ g/ml d'IAA lorsque la densité optique est égale  
20 à 32,5 ;

C : Expérience n° 4 : induction par 5  $\mu$ g/ml d'IAA lorsque la densité optique est égale à 63,5 ;

D : Expérience n° 3 : induction par 25  $\mu$ g/ml d'IAA lorsque la densité optique est égale à 62,5 ;

- 25 **PM :** Marqueur de poids moléculaire (kDa).

**FIGURE 6 :** Cinétiques de croissance de ICONE 200 x pVA-polio2B : influence du temps d'induction et de la concentration d'inducteur.

■ Expérience n° 1 : induction par 25  $\mu$ g/ml d'IAA lorsque la densité optique est égale à 32,5.

- 30 □ Expérience n° 2 : induction par 5  $\mu$ g/ml d'IAA lorsque la densité optique est égale à 32,5.

- Expérience n° 3 : induction par 25 µg/ml d'IAA lorsque la densité optique est égale à 62,5.
  - Expérience n° 4 : induction par 5 µg/ml d'IAA lorsque la densité optique est égale à 63,5.
- 5 Les flèches indiquent le moment de l'induction.

L'invention repose sur l'introduction stable de mutations dans le génome de la souche hôte. Toutes les modifications présentées dans les exemples ci-après sont introduites au locus *tna* d'*E. coli*, constitué schématiquement de l'enchaînement

10 suivant :

- A) promoteur *P<sub>tna</sub>*,
- B) séquence codante du gène *tnaA* (tryptophanase),
- C) région intergénique,
- D) séquence codante du gène *tnaB* (tryptophane-perméase),
- 15 E) terminateur de transcription.

Plus précisément, les modifications portent sur l'élément (B). Celui-ci est remplacé au profit d'un élément (b) dont les caractéristiques dans les diverses constructions sont les suivantes :

20 Tableau 1 : Nature des mutations portées par ICONE 100 et ICONE 200

Nom du mutant	Nature de l'élément (b)
ICONE 100	séquence codante de <i>tnaA</i> interrompue en position + 221 par un codon stop et un site de restriction <i>Xba</i> I
ICONE 200	séquence codante du gène <i>trpR</i> codant pour l'apoprésenseur de <i>P<sub>trp</sub></i>

#### Exemple 1 : Construction du mutant ICONE 100

- Un fragment d'ADN noté *tnaAT* est amplifié par PCR. Il s'étend des positions
- 25 - 275 à + 1054 par rapport au premier nucléotide de la séquence codante de *tnaA*. Ce fragment qui chevauche le promoteur *P<sub>tna</sub>* et *tnaA* est amplifié par réaction PCR en

deux parties. La partie I s'étend de la position - 275 à la position + 220. Elle est amplifiée à l'aide des oligonucléotides Trp5 (sens) et Trp2 (anti-sens) dont la séquence est :

TrpS : 5' - CGGGATCCGTGTGACCTCAAAATGGTT - 3'

5 BamHI

Trp2 : 3' – CTACGCGCCGCTGCTTCGGA<sup>T</sup>TAGATCTCG – 5'

(anti-sens) stop XbaI

La partie II se situe dans la séquence codante de *tnaA*, immédiatement en 3' de la partie I. Elle s'étend des positions + 221 à + 1054. Elle est amplifiée à l'aide des oligonucléotides Trp3 et Trp4 :

10 oligonucléotides Trp3 et Trp4 :

Trp3 : 5' - CGTCTAGACAGCGGCAGTCGTAGCTAC - 3'

XbaI

Trp4 : 3' – CCTTCTCTAACCGCAACAGTTCGAACG – 5'

(anti-sens) HindIII

15 Les réactions de PCR sont effectuées en utilisant comme matrice des colonies d'*E. coli* K-12 lysées dans le tampon de la Taq polymérase (AmpliTaq Gold CETUS, USA).

Les produits d'amplification sont précipités à l'éthanol puis digérés avec les enzymes de restriction appropriées (BamHI - XbaI pour la partie I, XbaI - HindIII pour la partie II). Une analyse sur gel d'agarose coloré au BET permet de vérifier que les fragments ont la taille attendue (Deeley & Yanofsky, 1981). Le fragment tnaAT est généré en ligant les deux fragments I et II au site XbaI. Il diffère de la séquence naturelle par la présence d'un codon stop en position + 221 suivi d'un site de restriction XbaI. Ce fragment tnaAT est cloné aux sites BamHI / HindIII dans le vecteur pRIT28 (Hultman, Stahl, Hornes & Uhlen, 1989) et séquencé. Le fragment tnaAT est sous-cloné dans le vecteur pMAK705 (Hamilton, Aldea, Washburn, Babitzke & Kushner, 1989), donnant pMAK705[tnaAT].

La méthode employée pour générer un réarrangement génétique chez *E. coli* est celle décrite par Hamilton et al. (1989). Elle est basée sur l'emploi du vecteur suicide pMAK705 qui porte une origine de réplication thermosensible, fonctionnelle à 30°C mais inactive au-delà de 42°C, ainsi que le gène de résistance au chloramphénicol (CMP). *E. coli* RV308 (Maurer, Meyer & Ptashne, 1980) est transformé par 4 µg du

vecteur pMAK705[tnaAT] et le mélange de transformation est étalé sur boîtes de milieu LB + CMP 20 µg/ml. Après incubation une nuit à 30°C, trois clones sont repiqués en milieu liquide LB + CMP 20 µg/ml et incubés à 30°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO à 580 nm voisine de 1. Les suspensions sont ensuite étalées sur milieu LB +  
5 CMP 20 µg/ml et incubées à 44°C et à 30°C. Les colonies qui se développent à 44°C (= co-intégrants) sont porteuses d'une intégration chromosomique du vecteur, cette intégration étant favorisée par l'existence d'homologies de séquence entre le chromosome et l'insert porté par le vecteur.

La phase dite de résolution consiste à favoriser l'excision du vecteur par un  
10 mécanisme de recombinaison entre des séquences répétées présentes sur le chromosome. Quelques clones isolés à 44°C sont cultivés en milieu liquide LB + CMP 20 µg/ml à 30°C pendant trois jours en renouvelant le milieu régulièrement. Les suspensions sont ensuite diluées, étalées sur milieu gélosé LB + CMP 20 µg/ml et incubées à 30°C jusqu'à l'apparition de colonies individualisées. Plusieurs dizaines de  
15 colonies sont repiquées en double sur milieu gélosé LB + CMP 20 µg/ml à 30°C et 44°C. Les colonies qui ne se développent pas à 44°C sont retenues et criblées par une réaction de PCR indiquant si la résolution du vecteur a conservé le codon stop et le site XbaI au locus *tnaA*. Les oligonucléotides utilisés sont Trp6 (sens) et Trp7 (anti-sens), respectivement homologues à la mutation désirée et à une partie du terminateur de  
20 tnaA :

Trp6 : 5' – CGACGAAGCCTAATCTAGA – 3'

stop XbaI

Trp7 : 3' – CCGATATTCCTACAATCGG – 5'

(anti-sens)

25 Sur dix-huit clones criblés, neuf donnent un fragment d'amplification de la taille attendue indiquant la présence du codon stop suivi du site XbaI dans le gène *tnaA*. Les neuf autres clones ne donnent pas de produit d'amplification, probablement parce que l'étape de résolution a restauré sur le chromosome le gène *tnaA* non muté. Parmi les neuf clones positifs, quatre sont prélevés et soumis à un curage du plasmide par  
30 repiquages successifs en absence de pression de sélection. Après quelques jours de culture, on obtient des clones redevenus sensibles au chloramphénicol.

La présence de la mutation inactivant *tnaA* est confirmée de deux manières différentes : d'abord, une amplification par PCR à l'aide des oligonucléotides Trp5 et Trp4 suivie d'une digestion par XbaI montre que le site de restriction, absent chez *E. coli* RV308, est présent dans le gène *tnaA* des mutants ; ensuite, par une culture des mutants dans un milieu riche en tryptophane suivie du test à l'indole (ajout du réactif de Kovacs dans le milieu de culture), on montre que les mutants n'ont pas généré d'indole alors que la souche RV308 d'origine produit de l'indole dans les mêmes conditions. On en déduit que la mutation introduite entraîne une perte de l'activité tryptophanase.

Un clone est sélectionné en vue d'une conservation sous forme congelée. Il est nommé ICONE 100.

#### Exemple 2 : Construction du mutant ICONE 200

Un fragment d'ADN est construit in vitro par amplification PCR de trois sous-unités.

La première sous-unité située dans le promoteur *Ptna* s'étend des positions - 511 à + 3 par rapport au premier nucléotide de la séquence codante de *tnaA*. Elle est amplifiée à partir des oligonucléotides TrpR1 (biotinylé en 5') et TrpR2 :

TrpR1 : 5' – CTGGATCCCTGTCAGATGCGCTTCGC - 3'

BamHI

TrpR2 : 3' – CTTCTAATACATTACCGGGTTG - 5'

(anti-sens)

La seconde sous-unité correspond à la séquence codante du gène *trpR* d'*E. coli*. Elle est amplifiée à partir des oligonucléotides TrpR3 et TrpR4 (biotinylé en 5') :

TrpR3 : 5' – GTAATGGCCCAACAATCACC - 3'

start

TrpR4 : 3' – CACAACGACTTTTCGCTAACTGACGTCAG - 5'

(anti-sens)

PstI

La troisième sous-unité correspond à la séquence située immédiatement en 3' de la séquence codante de *tnaA*. Elle contient la région intergénique de l'opéron *tna* et une partie du gène *tnaB* codant pour la tryptophane-perméase. Elle est amplifiée à partir des oligonucléotides TrpR5 et TrpR6 :

TrpR5 : 5' - CGCTGCAGTTAATACTACAGAGTGG - 3'

PstI

TrpR6 : 3' - CCAGCTAATGAGGTAAGTTCGAAC - 5'

(anti-sens)

HindIII

5 Les fragments amplifiés sont purifiés selon la méthode GeneClean (Bio101, La Jolla, CA, USA).

Les sous-unités I et II sont fusionnées de la manière suivante. Dans deux tubes séparés, chaque sous-unité est mise en incubation avec 30 µl de billes marquées à la streptavidine (Dynabeads, DYNAL, Norvège). Après 20 min à 37°C et 5 min à  
10 température ambiante, l'ADN fixé est dénaturé par 50 µl de NaOH 0,15 M. Les ADN simple-brin récupérés dans chaque surnageant sont mélangés à parts égales et soumis à une réaction d'hybridation et d'extension en présence de la Taq polymérase (AmpliTaq Gold, CETUS, USA) suivant cinq cycles de PCR. Le produit de la réaction est amplifié dans une réaction PCR à l'aide des oligonucléotides TrpR1 et TrpR4.

15 Le produit d'amplification purifié par GeneClean est digéré par BamHI et PstI. Le fragment ainsi isolé est cloné dans le vecteur pRIT28 pour donner pRIT28[Ptna::trpR], puis séquencé.

La sous-unité III est digérée par les enzymes PstI et HindIII puis clonée dans pRIT28 pour donner pRIT28[3'tna], puis la séquence est vérifiée par séquençage ADN  
20 (ABI 373A, Perkin Elmer, USA).

Le vecteur pRIT28[Ptna::trpR] est digéré par les enzymes PstI et HindIII puis ligué en présence de la sous-unité III elle-même isolée à partir de pRIT28[3'tna] par double digestion PstI/HindIII. Le vecteur résultant est nommé pRIT28[Ptna::trpR::3'tna]. L'insert est transféré dans pMAK705 après double digestion  
25 par les enzymes BamHI et HindIII. Le plasmide résultant est nommé pMAK705[Ptna::trpR::3'tna].

L'intégration de la fusion Ptna::trpR::3'tna au locus tna d'*E. coli* RV308 est réalisée dans des conditions analogues à celles décrites dans l'exemple 1. Brièvement, la souche est transformée par le vecteur pMAK705[Ptna::trpR::3'tna] puis soumise aux  
30 étapes d'intégration et de résolution.

Le criblage des colonies en fin de résolution fait appel à des conditions légèrement différentes de celles de l'exemple 1. Le locus *tna* est amplifié par PCR à partir des oligonucléotides TrpR11 et TrpR7 :

TrpR11 : 5' – GGGCAGGTGAAGTGGTGGCG – 3'

5 TrpR7 : 3' – GGTGCCGTTATAAGGGTCGGAC – 5' –  
(anti-sens)

TrpR11 s'hybride avec la séquence de Ptna en amont (5') de TrpR1, et TrpR7 s'hybride avec la séquence de *tnaB*, en aval (3') de TrpR6. Le produit d'amplification a une taille différente suivant que le gène placé en aval de Ptna est *tnaA* (situation rencontrée dans RV308) ou *trpR* (situation recherchée chez les mutants). Une colonie possédant *trpR* au locus *tna* est conservée et nommée ICONE 200. Une analyse de sa séquence chromosomique montre qu'elle possède le gène *trpR* immédiatement en aval du promoteur Ptna. Une culture en présence de tryptophane atteste l'absence de formation d'indole, ce qui est une conséquence logique de la perte du gène *tnaA*.

15

### Exemple 3 : Fuite d'expression en présence de succinate + tryptophane

Cet exemple décrit les capacités relatives de *E. coli* RV308, ICONE 100 et ICONE 200 à contrôler l'expression d'une protéine recombinante sous le contrôle du promoteur Ptrp. A cet effet, nous avons construit un vecteur d'expression noté pVA- $\beta$ gal dans lequel la séquence codant pour la  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* est placée en aval du promoteur Ptrp. Le vecteur d'origine utilisé pour cette construction est pVAABP308 (Murby, Samuelsson, Nguyen, et al., 1995).

Chacune des trois souches est transformée par le vecteur pVA- $\beta$ gal. Les transformants obtenus sont cultivés individuellement dans un milieu complet (Tryptic Soy Broth (DIFCO) 30 g/l, Yeast Extract (DIFCO) 5 g/l) pendant une nuit à 37°C. Un aliquot de ces précultures est transféré dans 60 ml de milieu M9.YE.SUCC (solution de sels M9 1X (DIFCO), Yeast Extract (DIFCO) 5 g/l, succinate de sodium 20 g/l). Après un temps d'incubation à 37°C permettant d'atteindre la phase exponentielle de la croissance, un prélèvement est effectué sur chaque culture. La croissance est estimée par la Densité Optique à 580 nm de la suspension bactérienne. Le niveau d'activité  $\beta$ -galactosidase est mesuré dans chaque culot cellulaire. Pour cela, 1 ml de culture est centrifugé 3 min à 12 000 g. Le culot cellulaire est repris dans 900  $\mu$ l de tampon (Tris-

30

HCl 50 mM pH 7,5 - EDTA 1 mM - NaCl 100 mM - lysozyme 400 µg/ml) et incubé 15 min à 37°C. 100 µl de SDS (1 % dans Tris-HCl 50 mM pH 7,5) sont ajoutés et l'échantillon est placé 5 min à température ambiante. Le dosage s'effectue en mélangeant 30 µl d'échantillon, 204 µl de tampon (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 - MgCl<sub>2</sub> 1 mM) et 66 µl d'ONPG (4 mg/ml dans Tris-HCl 50 mM pH 7,5). Le mélange réactionnel est placé en incubation à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 500 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. La DO à 420 nm rapportée au temps d'incubation est proportionnelle à l'activité β-galactosidase présente dans l'échantillon. Sachant que *E. coli* RV308 a une délétion complète de l'opéron lac (Maurer, Meyer & Ptashne, 1980), l'activité β-galactosidase mesurée est uniquement due à l'expression du gène porté par le vecteur pVA-βgal.

Le tableau 2 résume les résultats obtenus avec chacune des souches RV308, ICONÉ 100 et ICONÉ 200.

Tableau 2 : Croissance des souches RV308, ICONÉ 100 et ICONÉ 200 et fuite d'expression (moyenne et écart-type sur trois expériences)

	DO 580 nm	β-GAL (U/ml)
RV308	2,47 ± 0,01	0,93 ± 0,09
ICONÉ 100	3,69 ± 0,24	0,21 ± 0,03
ICONÉ 200	2,43 ± 0,03	0,02 ± 0,00

Les résultats du tableau 2 montrent que les mutants de la lignée ICONÉ se développent au moins aussi bien que la souche RV308 dont ils sont issus. Les mutations introduites n'ont donc pas d'effet négatif sur la croissance. Par ailleurs, l'activité β-galactosidase mesurée est différente chez les trois souches. ICONÉ 100 possède une activité intracellulaire environ 4,5 fois inférieure à celle de RV308. Dans des conditions - succinate comme source de carbone - où l'activité du promoteur P<sub>tna</sub> est maximale (Botsford & DeMoss, 1971), la délétion du gène de la tryptophanase conduit donc à une réduction de la fuite d'expression, probablement en limitant la dégradation du tryptophane intracellulaire (co-répresseur). Dans ces mêmes conditions, le niveau de



5 fuite d'expression chez ICONÉ 200 est encore diminué d'un facteur 10 par rapport à  
ICONÉ 100. L'activité du promoteur P<sub>trp</sub> plasmidique est donc minimale chez ICONÉ  
200. D'une part, la perte de l'activité tryptophanase donne à la bactérie la possibilité de  
mieux contrôler P<sub>trp</sub> comme cela est démontré pour ICONÉ 100. Mais ICONÉ 200  
possède une seconde caractéristique qui la distingue d'ICONÉ 100 sur le plan génétique  
et lui donne au niveau expérimental un avantage supplémentaire en termes de contrôle  
de l'expression. Ainsi, dans des conditions où P<sub>tna</sub> est actif, ICONÉ 200 a la possibilité  
de diriger la surexpression de l'apoprésenseur T<sub>prR</sub> et par conséquent la fuite  
d'expression mesurée au niveau du promoteur P<sub>trp</sub> plasmidique est réduite d'un facteur  
10 proche de 50 par rapport à la souche d'origine RV308.

#### Exemple 4 : Fuite d'expression en présence de glycérol + tryptophane

Cet exemple démontre l'avantage apporté par le mutant ICONÉ 200 dans un  
milieu de culture et des conditions de fermentation proches de celles qui pourraient être  
15 utilisées industriellement pour produire des protéines recombinantes avec le système  
P<sub>trp</sub>.

Chacune des trois souches RV308, ICONÉ 100 et ICONÉ 200 est transformée  
par le vecteur pVA-βgal. Les transformants obtenus sont cultivés individuellement dans  
200 ml de milieu complet (Tryptic Soy Broth (DIFCO) 30 g/l, Yeast Extract (DIFCO)  
20 5 g/l) pendant une nuit à 37°C.

La suspension cellulaire obtenue est transférée stérilement dans un fermenteur  
(modèle CF3000 de Chemap, capacité 3,5 l) contenant 1,8 litres du milieu suivant  
(concentrations pour 2 litres de culture finale) : glycérol 90 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l,  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g/l, Na<sub>3</sub>-citrate 2H<sub>2</sub>O 9 g/l, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 2 g/l, extrait de  
25 levure 1 g/l, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 30 mg/l, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 8 mg/l, CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 7 mg/l, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>  
2H<sub>2</sub>O 7 mg/l, MnSO<sub>4</sub> 1H<sub>2</sub>O 10 mg/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2 mg/l, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 8 mg/l, FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O  
54 mg/l, antimousse 0,06 %, tétracycline 8 mg/l, tryptophane 200 mg/l. Le pH est régulé  
à 7,0 par ajout d'ammoniaque. Le taux d'oxygène dissous est maintenu à 30 % de la  
saturation par asservissement de la vitesse d'agitation puis du débit d'aération à la  
30 mesure de l'O<sub>2</sub> dissous. Lorsque la Densité Optique de la culture atteint une valeur  
comprise entre 40 et 45, on procède à l'induction par l'ajout de 25 mg/l d'acide indole-  
acrylique (SIGMA).

Une analyse en cinétique de la densité optique de la culture (DO à 580 nm de la suspension) et de l'activité  $\beta$ -galactosidase intracellulaire (voir exemple 3) est effectuée. Les figures 1 et 2 illustrent respectivement les cinétiques de croissance et d'activité  $\beta$ -galactosidase des trois cultures.

5 Les données présentées en figure 1 confirment l'observation de l'exemple 3 : les trois souches ont des cinétiques de croissance comparables. Les mutants de la lignée ICONÉ ont de ce point de vue conservé le potentiel de croissance de *E. coli* RV308 et ils demeurent donc des candidats potentiels pour une utilisation industrielle.

Les données de la figure 2 montrent l'impact des mutations portées par les  
10 souches ICONÉ sur l'expression de la  $\beta$ -galactosidase en fermenteur. Clairement, sur un milieu à base de glycérol, la présence ou l'absence de l'activité tryptophanase n'a pas d'effet sur le contrôle de l'expression comme en atteste la première partie des courbes RV308 et ICONÉ 100, même si l'on constate que le tryptophane exogène disparaît plus rapidement dans la culture RV308 que dans celle d'ICONÉ 100 (données  
15 non présentées). En revanche, le mutant ICONÉ 200 présente de meilleures capacités à contrôler l'expression en début de culture : l'activité  $\beta$ -galactosidase reste faible pendant les 18 premières heures de culture puis commence à augmenter à partir de  $t = 20$  h, moment où la concentration en tryptophane extracellulaire devient nulle (données non présentées). La deuxième partie de la courbe concernant ICONÉ 200 montre que  
20 l'activité  $\beta$ -galactosidase augmente régulièrement pour atteindre un niveau en fin de culture proche de celui obtenu avec RV308. En cela, nous démontrons que le système de régulation présent chez ICONÉ 200 apporte un contrôle transitoire du promoteur P<sub>trp</sub> plasmidique. Ce contrôle, exercé par le tryptophane et/ou la source de carbone, devient inopérant dans la deuxième partie de la culture et ne vient pas s'opposer à une  
25 expression maximale de la protéine recombinante.

#### Exemple 5 : Contrôle de l'expression d'une protéine toxique

Cet exemple décrit le comportement des souches RV308 et ICONÉ 200 en culture lorsqu'elles sont transformées par un vecteur portant, en aval du promoteur  
30 tryptophane, le gène d'une protéine toxique. A titre d'exemple et pour illustrer l'invention, le gène d'intérêt est celui codant pour la protéine 2B du poliovirus. Il a été décrit que la surexpression de cette protéine modifie la perméabilité des membranes

chez les bactéries (Lania et al., 1992) ainsi que dans les cellules eucaryotes (Aldabe et al., 1996), ce qui en fait un modèle de choix pour étudier les conséquences de la fuite d'expression chez *E. coli*.

Le gène codant pour la protéine 2B est amplifié à partir du vecteur pET3.2B  
5 (Lama et al., 1992) par une réaction de PCR à l'aide des oligonucléotides suivants : —

PO2.1 5' – GCGAATTCTGGCATCACCAATTACATAG – 3'

(sens) EcoRI

PO2.21      5' - GCAAGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTTGCTTGATGACATAA

(anti-sens) HindIII

10 GGTATC - 3'

Le produit d'amplification est ensuite digéré par les enzymes de restriction EcoRI et HindIII puis cloné dans un vecteur d'expression dérivé de pBR322 portant le promoteur tryptophane P<sub>trp</sub>. Le vecteur résultant, nommé pVA-polio2B, porte une séquence codant pour la protéine 2B fusionnée à son extrémité C-terminale à une queue poly(His), sous le contrôle du promoteur P<sub>trp</sub>.

Le vecteur pVA-polio2B est introduit dans les bactéries *E. coli* RV308 et ICONE 200 par transformation. Un clone recombinant de chaque construction est ensuite cultivé dans des conditions similaires à celles décrites dans l'exemple 4.

Les cinétiques de croissance des bactéries RV308 et ICONÉ 200 mesurées par la densité optique à 580 nm sont présentées en figure 3. Il y apparaît nettement que RV308 présente un retard de croissance important : le temps de génération moyen en fermenteur pendant les premières 14 heures de culture est de 1 h 45 min. contre seulement 1 h 17 min. pour ICONÉ 200. Après 24 heures de culture, la densité optique pour la souche RV308 est seulement égale à 13. De manière surprenante, la souche ICONÉ 200 atteint, elle, une densité optique égale à 37 après 17 h 30 min. de culture, âge où est effectuée l'induction par ajout d'acide indole acrylique (IAA) à 25 µg/ml. L'effet de l'induction est immédiat : la vitesse de consommation d'oxygène chute brusquement (données non présentées) et la croissance s'arrête.

Des prélèvements à différents temps de culture ont été effectués et analysés pour leur contenu en protéine recombinante. Des échantillons de biomasse centrifugés à 8 000 g sont repris par un tampon P1 (Tris 25 mM, EDTA 1,15 mM, lysozyme 1 mg/ml, pH 8) à raison de 5 ml pour 1 g de biomasse. La biomasse est remise en suspension,

incubée 15 min. à température ambiante puis soumise à une sonication pendant 2 min. Le lysat est centrifugé de nouveau (10 000 g, 15 min., 4°C) pour donner une fraction soluble (surnageant) et une fraction insoluble (culot repris par 200 µl de tampon P2 : Tris 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Ces échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide et soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le gel est ensuite transféré sur membrane selon la technique du Western-blot pour révéler la présence de la protéine recombinante. L'anticorps utilisé est un monoclonal anti-poly(His) couplé à la peroxydase (Sigma). La révélation est effectuée par chimioluminescence avec le kit ECL+ (Amersham). Les figures 4A et 4B présentent le résultat des immuno-blots sur les fractions insolubles issues respectivement des cultures de RV308 et ICONÉ 200. La figure 4A montre que la protéine recombinante est présente dans tous les prélèvements, c'est-à-dire dès le début de la culture jusqu'au temps de fermentation  $t = 24$  h alors qu'aucune induction par l'IAA n'a été effectuée. En revanche, avec ICONÉ 200, aucune protéine recombinante n'est détectée avant induction (figure 4B). C'est seulement après induction par l'IAA que la protéine 2B est détectable (dans la fraction insoluble) et que la manifestation de son caractère toxique est observée. Ainsi, ces résultats mettent en évidence que le mutant ICONÉ 200 a un avantage manifeste par rapport à la souche RV308 dont il est issu et permet de réaliser un contrôle efficace de l'expression en fermenteur.

20

#### Exemple 6 : Production d'une protéine toxique

Cet exemple vise à démontrer qu'une protéine toxique peut être exprimée dans une culture d'*E. coli* ICONÉ 200 à forte densité cellulaire dans des conditions de culture adaptées à une extrapolation industrielle. Dans ce but, la souche *E. coli* ICONÉ 200 transformée par le vecteur pVA-polio2B est évaluée. Les résultats obtenus à l'exemple 5 indiquent que les conditions d'induction doivent être optimisées si l'on veut éviter que l'expression se traduise instantanément par un arrêt de croissance puis par une lyse bactérienne. Aussi, cet exemple décrit différents essais destinés à optimiser le rendement en protéine recombinante par unité de volume fermenté en jouant sur la concentration d'inducteur et la densité cellulaire à l'induction. Les conditions de culture utilisées sont celles décrites dans l'exemple 4.

30

Les combinaisons expérimentales testées sont les suivantes :

- Expérience n° 1 : induction par 25 µg/ml d'IAA lorsque la densité optique est comprise entre 30 et 35 ;
- Expérience n° 2 : induction par 5 µg/ml d'IAA lorsque la densité optique est comprise entre 30 et 35 ;
- 5 ■ Expérience n° 3 : induction par 25 µg/ml d'IAA lorsque la densité optique est comprise entre 60 et 65 ;
- Expérience n° 4 : induction par 5 µg/ml d'IAA lorsque la densité optique est comprise entre 60 et 65.

Pour chaque expérience, des échantillons de biomasse sont prélevés à différents  
10 temps après l'induction et analysés selon le protocole suivant. Environ 20 grammes de biomasse sont repris dans 100 ml de Start Buffer 1X (préparé à partir du concentré 8X : 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,11 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 23,38 g NaCl, q.s.p. 100 ml, pH 7,4). La suspension est traitée par sonication 3 x 5 min puis centrifugée 30 min à 20 000 g, 4°C. Le culot est repris par 15 ml de Start Buffer + guanidine-HCl 6 M + 0,1 % SB3-14 (N-tétradécyl-N,N-diméthyl-3-ammonio-1-propanesulfonate, Sigma) puis mis en  
15 incubation dans la glace pendant 1 heure. La suspension est centrifugée 1 heure à 30 000 g, 4°C. Le surnageant est filtré sur 0,45 µ en vue de sa purification par chromatographie d'affinité sur métal chélaté. Une colonne contenant 1 ml de gel (HiTrap Chelating, Amersham Pharmacia Biotech) est chargée avec 1 ml de  $\text{NiSO}_4$  0,1  
20 M, lavée par 5 ml d'eau puis équilibrée par 30 ml de Start Buffer + guanidine-HCl 6 M + 0,1 % SB3-14. L'échantillon est ensuite chargé sur la colonne. Un rinçage avec 60 ml de Wash Buffer (Start Buffer + guanidine-HCl 6 M + 0,1 % SB3-14 + imidazole 20 mM) permet d'éliminer la majorité des protéines fixées par des interactions non spécifiques. La protéine recombinante polio-2B est éluée par 10 x 1 ml de tampon  
25 d'élution (Start Buffer + guanidine-HCl 6 M + 0,1 % SB3-14 + imidazole 300 mM). Les fractions les plus concentrées en protéines sont regroupées puis dessalées sur gel Sephadex G-25 (colonnes PD10, Amersham Pharmacia Biotech). La qualité et la quantité de protéine polio-2B ainsi obtenue sont estimées respectivement par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et par un dosage des protéines  
30 totales (méthode au BCA, Pierce).

La figure 5 présente un gel SDS coloré au bleu de Coomassie des protéines polio-2B extraites et purifiées à la suite des expériences 1 à 4 décrites ci-dessus. La

taille de la protéine recombinante correspond à la taille théorique (11 kDa) prédite à partir de sa séquence codante. De plus, elle correspond à la taille de la protéine majoritaire observée en Western-blot après induction, dans le lysat d'*E. coli* ICONÉ 200 x pVApolio-2B (figure 4B). Il est donc vraisemblable que les protéines visibles sur la figure 5 correspondent à la protéine 2B du poliovirus fusionnée à une queue poly-histidine. Par ailleurs, la qualité des protéines obtenues est identique dans toutes les conditions d'induction testées.

Le tableau 3 ci-après résume les résultats obtenus en combinant différents facteurs tels que Densité Optique à l'induction, concentration en inducteur et temps de culture après induction.

**Tableau 3: Influence de la Densité Optique à l'induction, de la concentration en inducteur et du temps après induction sur le rendement d'expression d'une protéine toxique (exemple de polio-2B)**

N° d'expérience	Densité Optique (580 nm) de la culture au moment de l'induction	Concentration en inducteur (IAA, mg/l)	Temps après induction (HH :MM)	Quantité de protéine extraite et purifiée (mg par litre de milieu)
1	32,5	25	00 :45	3
			01 :45	2
2	32,5	5	00 :45	6
			01 :45	6
3	62,5	25	00 :45	5,5
			02 :45	7,5
4	63,5	5	00 :45	6
			02 :50	9

En comparant les groupes d'expériences (1-2) et (3-4), on observe que plus l'induction est réalisée tardivement, plus le rendement d'expression est élevé. Ceci confirme l'intérêt de faire croître la biomasse le plus possible avant de déclencher l'induction. Dans le cas des expériences (3-4), environ 70 % du substrat carboné est consommé au moment où l'expression de la protéine polio-2B est déclenchée. Avec une souche telle que ICONÉ 200, la phase de croissance cellulaire et la phase d'expression sont totalement séparées, ce qui permet d'optimiser le rendement en protéine recombinante, même lorsque cette protéine est toxique.

Parallèlement au temps d'induction, la concentration en inducteur est également un paramètre influent. Le meilleur résultat d'expression obtenu dans cet exemple correspond à l'expérience n° 4 où la concentration d'inducteur rapportée au nombre de cellules est la plus faible (5 mg/l d'IAA pour une culture dont la densité optique est égale à 63,5). C'est également dans cette expérience que l'effet toxique de l'expression de polio-2B est le moins marqué puisque la culture continue à se développer après l'induction alors que la croissance est stoppée complètement dans toutes les autres expériences (voir figure 6). Il est donc particulièrement important d'ajuster les conditions d'induction d'une protéine toxique, de manière à trouver l'optimum entre une concentration en inducteur trop faible pour donner lieu à une expression significative et une concentration trop forte provoquant l'arrêt immédiat du métabolisme bactérien. En comparant les résultats des expériences n° 4 et n° 1, on observe qu'une induction plus tardive (DO = 63,5 contre 32,5) et moins forte (concentration en IAA égale à 5 mg/l contre 25 mg/l) permet de multiplier par un facteur 3 à 4 la quantité de protéine recombinante obtenue par unité de volume fermenté.

La souche *E. coli* ICONÉ 200, obtenue par modification génétique selon l'invention d'une souche d'intérêt industriel, permet de contrôler strictement l'expression de tout gène placé sur un vecteur plasmidique en aval du promoteur tryptophane Ptrp. Ce contrôle est transitoire car médié par le tryptophane exogène apporté à la culture. Le potentiel d'induction de Ptrp dans ICONÉ 200 est conservé et demeure modulable par la concentration d'IAA. Grâce à ces caractéristiques, ICONÉ 200 permet l'expression contrôlée de protéines recombinantes dans des conditions de culture extrapolables à grande échelle.

Bibliographic

- Aldabe, R., Barco, A. & Carrasco, L. (1996). The Journal of Biological Chemistry 271, 23134-23137.
- 5 Botsford, J.L. & DeMoss, R.D. (1971). Catabolite repression of tryptophanase in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 105, 303-312.
- Deeley, M.C. & Yanofsky, C. (1981). Nucleotide sequence of the structural gene for tryptophanase of *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology, 147, 787-796.
- Gunsalus, R.P., Yanofsky, C. (1980). Nucleotide sequence and expression of *E. coli* *trpR*, the structural gene for the *trp* aporepressor. Proceeding of the National Academy  
10 of Sciences, USA, 77, 12, 7117-7121.
- Gunsalus, R.P., Gunsalus Miguel, A. & Gunsalus, G.L. (1986). Intracellular Trp repressor levels in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 167, 272-278.
- Hamilton, C.M., Aldea, M., Washburn, B.K., Babitzke, P. & Kushner, S.R. (1989). New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. Journal of  
15 Bacteriology, 171, 4617-4622.
- Hasan, N. & Szybalski, W. (1995). Construction of *lacI*ts and *lacI*qts expression plasmids and evaluation of the thermosensitive *lac* repressor. Gene, 163, 35-40.
- Hultman, T., Stahl, S., Hornes, E. & Uhlen, M. (1989). Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. Nucleic Acids  
20 Research, 17, 4937-4946.
- Isaacs, H., Chao, D., Yanofsky, C. & Saier, M.H. (1994). Mechanism of catabolite repression of tryptophanase synthesis in *Escherichia coli*. Microbiology, 140, 2125-2134.
- Kelley, R.L. & Yanofsky, C. (1982). *trp* aporepressor production is controlled by  
25 autogenous regulation and inefficient translation. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 79, 3120-3124.
- Lama, J. & Carrasco, L. (1992). The Journal of Biological Chemistry 267, 15932-15937.
- Maurer, R., Meyer, B.J. & Ptashne, M. (1980). Gene regulation at the right operator (OR) of bacteriophage lambda. I. OR3 and autogenous negative control by repressor.  
30 Journal of Molecular Biology, 139, 147-161.



- Murby, M., Samuelsson, E., Nguyen, T.N., Mignard, L., Power, U., Binz, H., Uhlen, M. & Stahl, S. (1995). Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of a recombinant protein from respiratory syncytial virus. *European Journal of Biochemistry*, 230, 38-44.
- 5 Nichols, B.P. & Yanofsky, C. (1983). Plasmids containing the *trp* promoters of *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* and their use in expressing cloned genes. *Methods in Enzymology*, 101, 155-164.
- Snell, E.E. (1975). Tryptophanase : structure, catalytic activities, and mechanism of action. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 42, 287-333.
- 10 Stark, M.J.R. (1987). Multicopy expression vectors carrying the *lac* repressor gene for regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Gene*, 51, 255-267.
- Stewart, V. & Yanofsky, C. (1985). Evidence for transcription antitermination control of tryptophanase operon expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 164, 731-740.
- 15 Suter-Crazzolara, C. & Unsicker, K. (1995). Improved expression of toxic proteins in *E. coli*. *BioTechniques*, 19, 202-204.
- Yanofsky, C. et al. (1981). The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 9, 24, 6647-6668.
- Yansura, D.G. & Bass, S.H. (1997). Application of the *E. coli* *trp* promoter. *Methods in*
- 20 *Molecular Biology*, 62, 55-62.
- Yansura, D.G. & Henner, D.J. (1990). Use of *Escherichia coli* *trp* promoter for direct expression of proteins. In Anonymous, *Methods in Enzymology*. (pp. 54-60). San Diego, CA: Academic Press, Inc.

REVENDICATIONS

1. Construction pour l'expression d'un gène codant pour une protéine recombinante d'intérêt placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron tryptophane P<sub>trp</sub> dans une cellule hôte procaryote, caractérisée en ce que la construction comprend une  
5 séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte.
2. Construction selon la revendication 1, caractérisée en ce que la cellule hôte procaryote est une bactérie Gram négative.
- 10 3. Construction selon la revendication 1, caractérisée en ce que la cellule hôte procaryote est *E. coli*.
4. Construction selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre en amont de ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est  
15 introduite dans ladite cellule hôte, tout ou partie de la séquence nucléique du promoteur P<sub>tna</sub> de l'opéron tryptophanase.
5. Construction selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte comprend  
20 un fragment muté de la séquence codante de ladite tryptophanase TnaA.
6. Construction selon la revendication 5, caractérisée en ce que ledit fragment muté est obtenu par l'insertion d'un codon stop à une position telle que la séquence du fragment muté ainsi obtenu code pour un fragment protéique dépourvu d'activité tryptophanase.
- 25 7. Construction selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que ledit fragment muté est un fragment mutée de la séquence codante de la tryptophanase TnaA de ladite cellule hôte.
8. Construction selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique capable d'inactiver le gène codant pour une tryptophanase  
30 TnaA lorsque ladite séquence nucléique est introduite dans ladite cellule hôte comprend une séquence nucléique comprenant tout ou partie de la séquence d'un promoteur suivie

en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp.

9. Construction selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature  
5 ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp est tout ou partie du promoteur Ptna de l'opéron tryptophanase d'*E. coli*.

10. Construction selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce que ladite séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur Ptrp est la séquence codant pour l'apoprésenseur  
10 TrpR de l'opéron tryptophane d'*E. coli* ou un de ses fragments biologiquement actifs.

11. Vecteur contenant une construction selon l'une des revendications 1 à 10.

12. Vecteur selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit du vecteur pMAK705[tnaAt] ou du vecteur pMAK705[Ptna::trpR::3'tna].

13. Cellule hôte procaryote transformée par un vecteur selon l'une des  
15 revendications 11 et 12.

14. Cellule hôte procaryote selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'*E. coli*.

15. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt dans une cellule hôte utilisant une construction selon l'une des revendications 1 à 10.

20 16. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon la revendication 15, dans lequel ladite construction est introduite dans l'ADN de la cellule hôte procaryote.

17. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon la revendication 15 ou 16, dans lequel ladite construction est introduite dans l'ADN de la  
25 cellule hôte procaryote par un vecteur selon la revendication 11 ou 12.

18. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 15 à 17, dans lequel ladite construction est introduite dans l'ADN de la cellule hôte procaryote selon la méthode d'intégration chromosomique décrite dans l'exemple 1 ou 2.

30 19. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 15 à 18, dans lequel ladite construction est introduite sans autre élément d'ADN qui permettrait d'y associer un avantage sélectif.

20. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 15 à 19, dans lequel ladite construction est introduite au locus de l'opéron tryptophanase d'*E. coli*.

21. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 15 à 20, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : —
- a) la transformation d'une cellule procaryote par un vecteur selon la revendication 11 ou 12, et l'intégration de ladite construction dans l'ADN de ladite cellule hôte ;
  - b) la transformation de ladite cellule procaryote par un vecteur contenant un gène codant pour ladite protéine recombinante d'intérêt ;
  - 10 c) la culture de ladite cellule transformée dans un milieu de culture permettant l'expression de la protéine recombinante ; et
  - d) la récupération de la protéine recombinante à partir du milieu de culture ou de ladite cellule transformée.

22. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon la revendications 21, caractérisé en ce que ledit procédé comprend en outre entre l'étape a) et b), une étape de résolution et de criblage.

23. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon l'une des revendications 15 à 22, dans lequel le contrôle de l'expression des protéines recombinantes avant induction du promoteur P<sub>trp</sub> est obtenu par l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur P<sub>trp</sub> selon l'une des revendications 8 à 10.

24. Procédé de production d'une protéine recombinante d'intérêt selon la revendication 23, dans lequel l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur P<sub>trp</sub> selon l'une des revendications 8 à 10 est obtenue par tout moyen permettant d'exercer un effet inhibiteur ou activateur sur ledit promoteur.

25. Procédé de production selon la revendication 24, dans lequel l'induction dudit promoteur suivi en 3' d'une séquence nucléique codant pour une molécule de nature ribonucléotidique ou protéique agissant négativement sur le promoteur P<sub>trp</sub> selon l'une des revendications 8 à 10 est obtenue soit :

- a) par le choix d'une source de carbone appropriée dans le milieu de culture ; soit

- b) par l'ajout de tryptophane dans le milieu de culture ; ou
- c) par une combinaison de a) et b).

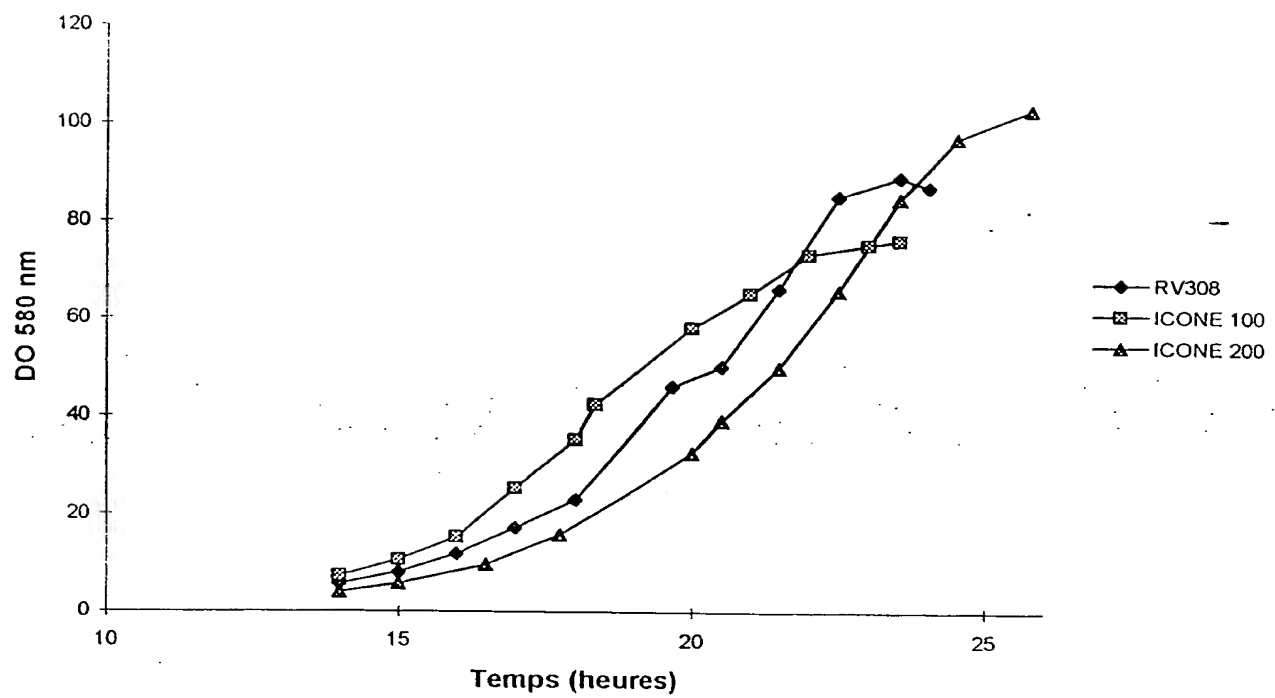


FIGURE 1

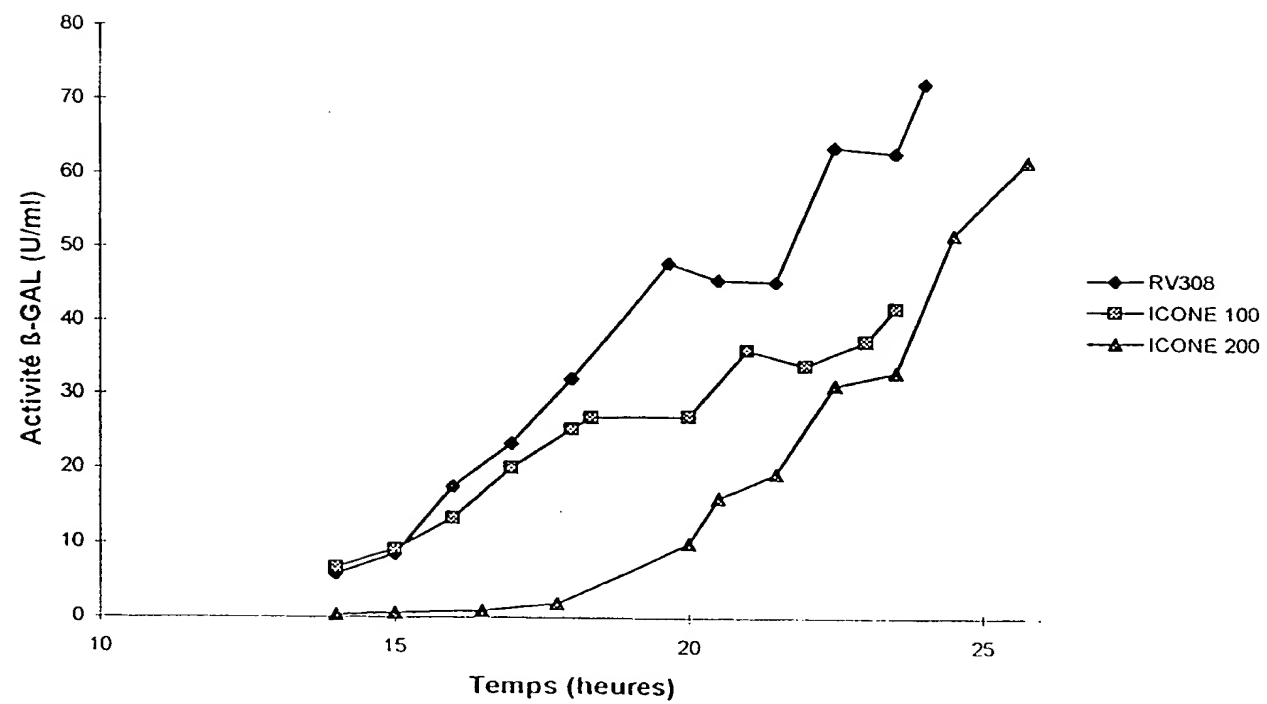


FIGURE 2

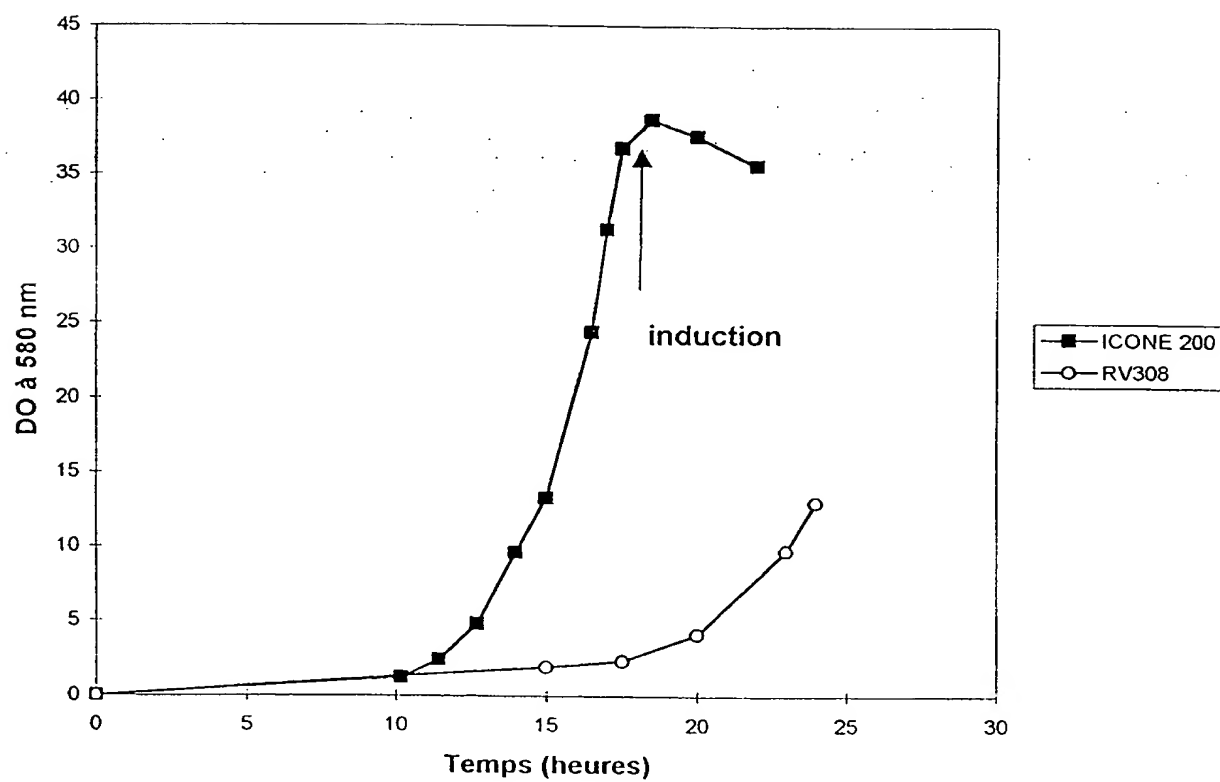


FIGURE 3

3/4

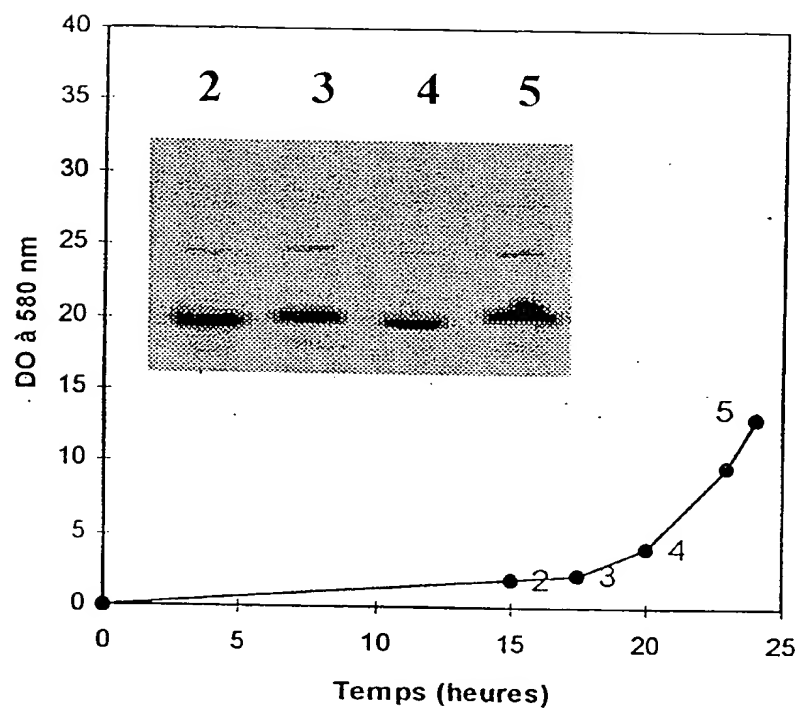


FIGURE 4A

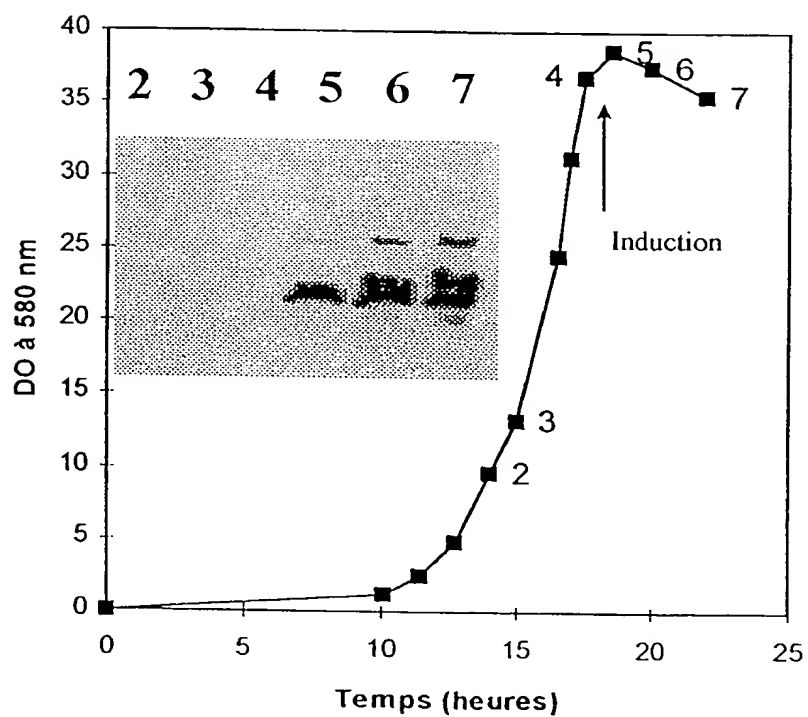


FIGURE 4B



4 / 4

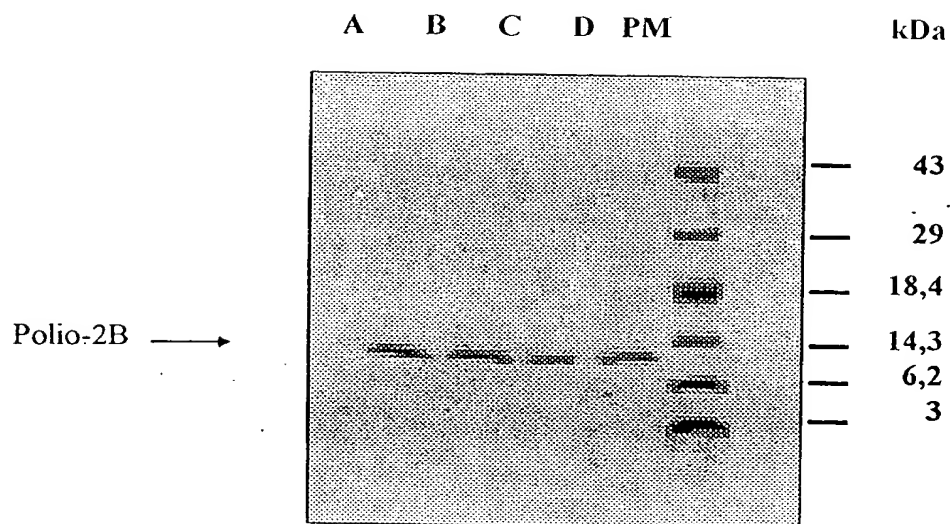


FIGURE 5

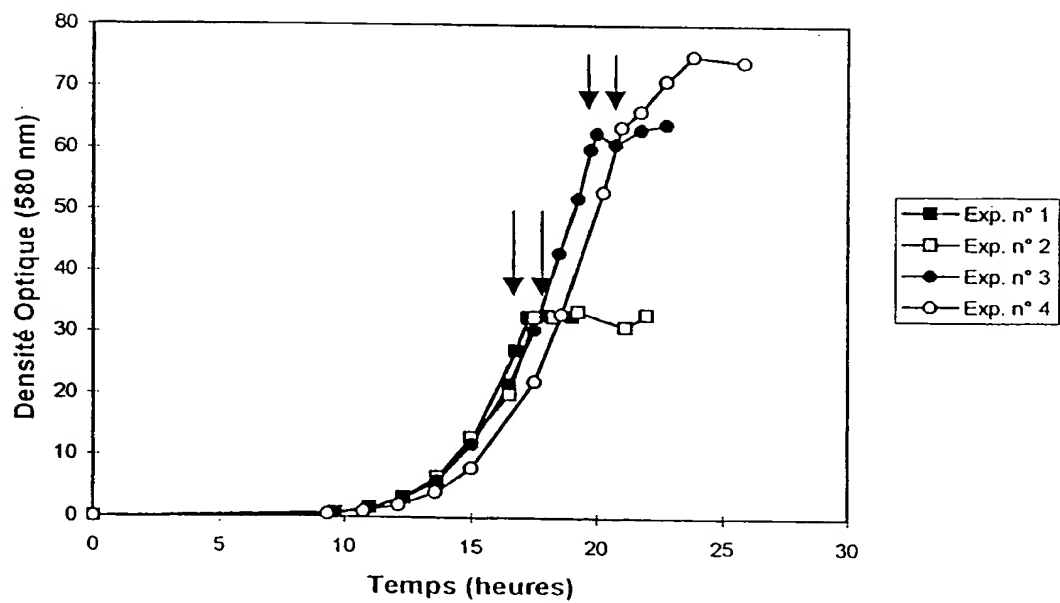


FIGURE 6

CLAIMS

1. Construct for expressing a gene encoding a recombinant protein of interest placed under the control of the Ptrp tryptophan operon promoter in a prokaryotic host cell, characterized in that the construct comprises a nucleic acid sequence which is capable of inactivating the gene encoding a TnaA tryptophanase when said nucleic acid sequence is introduced into said host cell.
2. Construct according to Claim 1, characterized in that the prokaryotic host cell is a Gram-negative bacterium.
3. Construct according to Claim 1, characterized in that the prokaryotic host cell is *E. coli*.
4. Construct according to one of Claims 1 to 3, characterized in that it also comprises, upstream of said nucleic acid sequence capable of inactivating the gene encoding a TnaA tryptophanase when said nucleic acid sequence is introduced into said host cell, all or part of the nucleic acid sequence of the Ptna tryptophanase operon promoter.
5. Construct according to one of Claims 1 to 4, characterized in that said nucleic acid sequence capable of inactivating the gene encoding a TnaA tryptophanase when said nucleic acid sequence is introduced into said host cell comprises a mutated fragment of the coding sequence of said TnaA tryptophanase.
6. Construct according to Claim 5, characterized in that said mutated fragment is obtained by inserting a stop codon at a position such that the sequence of the mutated fragment thus obtained encodes a protein fragment lacking tryptophanase activity.
7. Construct according to either of Claims 5 and 6, characterized in that said mutated fragment is a mutated fragment of the coding sequence of the TnaA tryptophanase of said host cell.

8. Construct according to one of Claims 1 to 4, characterized in that said nucleic acid sequence capable of inactivating the gene encoding a TnaA tryptophanase when said nucleic acid sequence is introduced into said host cell comprises a nucleic acid sequence comprising all or part of the sequence of a promoter followed, in the 3' position, by a nucleic acid sequence encoding a molecule which is ribonucleotide or protein in nature, and which acts negatively on the Ptrp promoter.
9. Construct according to Claim 8, characterized in that said promoter followed, in the 3' position, by a nucleic acid sequence encoding a molecule which is ribonucleotide or protein in nature, and which acts negatively on the Ptrp promoter, is all or part of the Ptna tryptophanase operon promoter of *E. coli*.
10. Construct according to either of Claims 8 and 9, characterized in that said nucleic acid sequence encoding a molecule which is ribonucleotide or protein in nature, and which acts negatively on the Ptrp promoter, is the sequence encoding the TrpR tryptophan operon aporepressor of *E. coli* or one of its biologically active fragments.
11. Vector containing a construct according to one of Claims 1 to 10.
12. Vector according to Claim 11, characterized in that it is the vector pMAK705[tnaAt] or the vector pMAK705[Ptna::trpR::3'tna].
13. Prokaryotic host cell transformed with a vector according to either of Claims 11 and 12.
14. Prokaryotic host cell according to Claim 13, characterized in that it is *E. coli*.
15. Method for producing a recombinant protein of interest in a host cell using a construct according to one of Claims 1 to 10.
16. Method for producing a recombinant protein of interest according to Claim 15, in which said construct is introduced into the DNA of the prokaryotic host cell.

17. Method for producing a recombinant protein of interest according to either of Claims 15 and 16, in which said construct is introduced into the DNA of the prokaryotic host cell with a vector according to either  
5 of Claims 11 and 12..

18. Method for producing a recombinant protein of interest according to one of Claims 15 to 17, in which said construct is introduced into the DNA of the prokaryotic host cell according to the chromosomal  
10 integration method described in Example 1 or 2.

19. Method for producing a recombinant protein of interest according to one of Claims 15 to 18, in which said construct is introduced without any other DNA element which would allow a selective advantage to be  
15 associated therewith.

20. Method for producing a recombinant protein of interest according to one of Claims 15 to 19, in which said construct is introduced at the tryptophanase operon locus of *E. coli*..

20 21. Method for producing a recombinant protein of interest according to one of Claims 15 to 20, characterized in that it comprises the following steps:

a) transforming a prokaryotic cell with a vector according to either of Claims 11 and 12, and  
25 integrating said construct into the DNA of said host cell;

b) transforming said prokaryotic cell with a vector containing a gene encoding said recombinant protein of interest;

30 c) culturing said transformed cell in a culture medium which allows the expression of the recombinant protein; and

d) recovering the recombinant protein from the culture medium or from said transformed cell.

35 22. Method for producing a recombinant protein of interest according to Claims 21, characterized in that said method also comprises, between step a) and b), a resolution and a screening step.

23. Method for producing a recombinant protein of interest according to one of Claims 15 to 22, in which control of the expression of the recombinant proteins before induction of the Ptrp promoter is obtained by inducing said promoter which is followed, in the 3' position, by a nucleic acid sequence encoding a molecule which is ribonucleotide or protein in nature, and which acts negatively on the Ptrp promoter according to one of claims 8 to 10.

24. Method for producing a recombinant protein of interest according to Claim 23, in which the induction of said promoter which is followed, in the 3' position, by a nucleic acid sequence encoding a molecule which is ribonucleotide or protein in nature, and which acts negatively on the Ptrp promoter according to one of claims 8 to 10 is obtained by any means enabling an inhibitory or activating effect to be exerted on said promoter.

25. Production method according to Claim 24, in which the induction of said promoter which is followed, in the 3' position, by a nucleic acid sequence encoding a molecule which is ribonucleotide or protein in nature, and which acts negatively on the Ptrp promoter according to one of Claims 8 to 10 is obtained either:

- a) by choosing a suitable carbon source in the culture medium; or
- b) by adding tryptophan to the culture medium; or
- c) by a combination of a) and b).

# PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>339790/17469</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 99/ 00874</b>	Date du dépôt international(jour/mois/année) <b>14/04/1999</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>14/04/1998</b>
Déposant  <b>PIERRE FABRE MEDICAMENT et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

### 1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

### 4. En ce qui concerne le titre,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

### 5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

### 6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☒ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

4

☐ Aucune des figures n'est à publier.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

No  
FR 99/00874

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12N15/71 C12N9/88

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	YANSURA D ET AL: "Use of Escherichia coli trp promoter for direct expression of proteins" METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 185, 1990, pages 54-60, XP002088409 cité dans la demande	1-25
A	EP 0 293 207 A (STANDARD OIL CO OHIO) 30 novembre 1988 (1988-11-30) colonne 5, ligne 48 - ligne 58	1-25
A	US 5 416 008 A (BAILEY JAMES E ET AL) 16 mai 1995 (1995-05-16) le document en entier	8-25
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 août 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/08/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lonnoy, 0

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	YANOFSKY C ET AL: "Some novel transcription attenuation mechanisms used by bacteria" BIOCHIMIE, vol. 78, no. 11-12, 1996, pages 1017-1024, XP002088410 le document en entier ---	
A	WARNE S ET AL: "Use of a modified Escherichia coli trpR gene to obtain tight regulation of high-copy-number expression vectors" GENE, vol. 46, 1986, pages 103-112, XP002088411 -----	



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00874

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12N15/71 C12N9/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANSURA D ET AL: "Use of Escherichia coli trp promoter for direct expression of proteins" METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 185, 1990, pages 54-60, XP002088409 cited in the application ---	1-25
A	EP 0 293 207 A (STANDARD OIL CO OHIO) 30 November 1988 (1988-11-30) column 5, line 48 - line 58 ---	1-25
A	US 5 416 008 A (BAILEY JAMES E ET AL) 16 May 1995 (1995-05-16) the whole document ---	8-25
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 1999

Date of mailing of the international search report

20/08/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040; Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lonnoy, 0

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00874

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YANOFSKY C ET AL: "Some novel transcription attenuation mechanisms used by bacteria"</p> <p>BIOCHIMIE, vol. 78, no. 11-12, 1996, pages 1017-1024, XP002088410 the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>WARNE S ET AL: "Use of a modified Escherichia coli trpR gene to obtain tight regulation of high-copy-number expression vectors"</p> <p>GENE, vol. 46, 1986, pages 103-112, XP002088411</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 99/00874

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0293207	A	30-11-1988	DK 293288 A	30-11-1988
			JP 1071478 A	16-03-1989
-----				
US 5416008	A	16-05-1995	NONE	
-----				